

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

L'EFFET DE LA LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE SUR LES VOIES DE  
SIGNALISATION DU CALCIUM ET SUR LES FONCTIONS  
OSTÉOBLASTIQUES

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

Par

Abdallah Fallah

SEPTEMBRE 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je remercie ma famille, mes collègues et mon professeur Robert Moreau pour leur soutien, leur patience et leur aide pour la réalisation de ce travail. Je remercie aussi le conseil de recherches en sciences naturelles et génie (CRSNG)

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
RÉSUMÉ.....	xi
1. Chapitre I	
PROBLÉMATIQUE.....	1
2. Chapitre II	
Etat des connaissances .....	3
2.1. Le tissu osseux.....	3
2.1.1. La matrice osseuse .....	3
2.1.2. Les cellules osseuses .....	4
2.1.2.1. Les cellules ostéoprogénitrices.....	5
2.1.2.2. Les ostéoblastes .....	5
2.1.2.3. Les ostéocytes.....	7
2.1.2.4. Les ostéoclastes .....	8
2.2. Le remodelage osseux .....	8
2.2.1. La phase d'activation .....	9
2.2.2. La phase de résorption.....	10
2.2.3. La phase d'inversion .....	10



2.2.4. La phase de formation du tissu osseux.....	11
2.3. L'ostéoporose .....	11
2.4. L'athérosclérose.....	14
2.5. Les LDL oxydées .....	16
2.6. Propriétés biochimiques de la lysoPC .....	16
2.7. La voie de signalisation induite par la lysoPC .....	18
2.8. Le calcium.....	22
2.9. Les canaux TRP.....	24
3. Chapitre III	
Hypothèses et objectifs.....	27
4. Chapitre IV	
Matériel .....	28
4.1 Présentations des modèles cellulaires.....	28
4.2 Produits.....	28
5. Chapitre V	
Article:« Lysophosphatidylcholine-induced cytotoxicity » .....	29
5.1 Contribution.....	29
5.2 Résumé.....	30
5.3 ABSTRACT .....	34
5.4 INTRODUCTION.....	36
5.5 MATERIALS AND METHODS .....	40

5.5.1 Cell culture .....	40
5.5.2 Cell viability assays .....	40
5.5.3 Cell death assays.....	41
5.5.4 Reverse-transcription polymerase chain reaction.....	41
5.5.5 Measurements of intracellular calcium.....	42
5.5.6 Immunolocalization .....	43
5.5.7 Statistical analysis .....	43
5.6 RESULTS.....	44
5.6.1 Effect of LysoPC on the viability of MG-63 .....	44
5.6.2 LysoPC triggers intracellular calcium mobilization and influx.....	45
5.6.3 Activation of TRP channels by lysoPC .....	46
5.6.4 Gene expression of TRPV channels by MG-63 cells. ....	47
5.6.5 Activation of TRPV channels by lysoPC is associated with cell death .....	48
5.7 DISCUSSION .....	49
5.8 Acknowledgements .....	53
6. Chapitre VI	
Résultats supplémentaires .....	66
6.1 Méthodes .....	66
6.1.1. Culture cellulaire.....	66
6.1.2. Détermination de l'effet de lysoPC sur la migration cellulaire.....	67

6.1.3. Etude de l'effet de la lysoPC sur la différenciation des MC3T3 .....	67
6.1.4. Dosage de la phosphatase alcaline (ALP) .....	67
6.1.4.1 Préparation des échantillons et extraction d'ALP .....	67
6.1.4.2 Dosage de l'activité d'ALP .....	68
6.1.5. Dosage des protéines par microBCA .....	68
6.1.6. Coloration des dépôts de calcium avec le rouge alizarine .....	68
6.1.7. La stimulation de la production des espèces réactives oxygénées (ROS) par la lysoPC .....	69
6.1.8 Approche statistique .....	69
6.2. Les résultats .....	69
6.2.1. La production de ROS et son implication dans la cytotoxicité de la lysoPC .....	69
6.2.2. L'effet de la lysoPC sur la migration des cellules MG63 .....	70
6.2.3. L'effet de la lysoPC sur la différenciation des cellules MC3T3 immatures en des cellules ostéoblastiques matures .....	70
 7. Chapitre VII	
Discussion .....	78
Conclusion .....	84
Annexe .....	86
Bibliographie .....	89

## LISTE DES FIGURES

Figure 2.1. Les cellules osseuses.....	4
2.2. La voie de signalisation activée par Wnt.....	6
2.3. La différenciation des ostéoblastes.....	6
2.4. Le remodelage osseux.....	9
2.5. «Représentation de la portion trabéculaire».....	12
2.6. Le développement de l'athérosclérose.....	16
2.7. Formation de la lysoPC.....	17
2.8. la répartition de la famille des protéines Gα.....	20
2.9. La voie de signalisation associée à Gαq.....	22
2.10. Les voies de signalisations liées au calcium.....	23
2.11. Structure des canaux TRPC.....	25
2.12. Structure des canaux TRPV.....	26
5.1. Cytotoxicity of lysoPC in MG-63 cells.....	58
5.2. LysoPC promotes cell death by apoptosis and necrosis.....	59
5.3. Involvement of calcium in the lysoPC-induced cell death.....	60
5.4. Characterization of calcium mobilization induced by lysoPC.....	61
5.5. Characterization of calcium influx induced by lysoPC.....	62
5.6. Expression of TRPV channels by MG-63 cells.....	63
5.7. Involvement of TRPV activation in lysoPC-induced cell death.....	64
5.8. LysoPC promotes apoptosis via TRPV activation.....	65
6.1. La stimulation de la production de ROS.....	72
6.2. Effet du NAC sur la cytotoxicité de la lysoPC dans les cellules MG-63.....	73
6.3. «Effets des inhibiteurs des canaux TRPV.....».....	74
6.4. Effet de la lysoPC sur la migration des cellules MG-63.....	75
6.5. «Le dosage de l'activité de la phosphatase.....».....	76

6.6. Le dosage de la minéralisation osseuse.....	77
--	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ALP phosphatase alcaline

AMP<sub>c</sub> adénosine monophosphate cyclique

BMP protéines morphogénétiques osseuses

Ca<sup>2+</sup> calcium

CREB cAMP response element-binding protein

DAG diacylglycérol

DCFDA « 2',7' -dichlorofluorescein diacetate »

ERK « extracellular signal-regulated kinases »

Fzd frizzled

GDP guanosine 5'-diphosphate

GPCR récepteurs couplés à une protéine G

GTP guanosine 5'-triphosphate

HDL lipoprotéines de haute densité

IL-1 interleukine-1

IL-6 interleukine-6

IP<sub>3</sub> inositol 1,4,5 triphosphate

IP3R récepteur IP3

LC<sub>50</sub> concentration causant 50% de létalité

LDL lipoprotéines de faible densité

LRP « LDL receptor-related proteins »

lysoPC lysophosphatidylcholine

MAPK « mitogen-activated protein kinases »

M-CSF « macrophage colony stimulating factor »

MM-LDL lipoprotéines de faible densité faiblement oxydées

NAC N-acétylcystéine

NADPH oxidase nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase

ODF: facteur de différenciation de l'ostéoclaste

OPG ostéoprotégérine

OSE2 élément spécifique de l'ostéoblaste 2  
OSX ostérix  
PIP<sub>2</sub> phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate  
PKC protéine kinase C  
PLC phospholipase C  
PTH hormone parathyroïdienne  
RANK « receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B »  
RANKL « receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand »  
RE réticulum endoplasmique  
ROS espèces réactives de l'oxygène  
RR rouge de ruthénium  
TCF facteur des cellules T  
Tg thapsigargine  
TGF $\beta$  facteur de transformation cellulaire  $\beta$   
TNF- $\alpha$  tumor necrosis factor  $\alpha$   
TRAP phosphatase acide résistante au tartrate  
TRP « transient receptor potential »  
TRPA « ankyrine transient receptor potential »  
TRPC1-7 « canonique transient receptor potential »  
TRPM1-8 « melastatine transient receptor potential »  
TRPML « mucolipine transient receptor potential »  
TRPN « non-mecanosensible transient receptor potential »  
TRPP « polycystine transient receptor potential »  
TRPV « vallinoid transient receptor potential »  
TRPV1-6 « vanilloïd transient receptor potential »  
Wnt: « wingless-integration site »

## RÉSUMÉ

Le tissu osseux est constamment renouvelé grâce au travail coopératif des cellules osseuses : les ostéoblastes qui forment l'os et les ostéoclastes qui le résorbent. Tout déséquilibre au niveau du remodelage osseux provoque plusieurs maladies notamment l'ostéoporose, caractérisée par la détérioration de la masse osseuse rendant l'os susceptible aux fractures. Certaines études ont révélé que des facteurs associés au développement de l'athérosclérose participent aussi au développement de l'ostéoporose. Les buts de l'étude étaient d'établir l'implication du calcium dans les voies de signalisation de la lysophosphatidylcholine (lysoPC), une des composantes des lipoprotéines de faible densité (LDL) oxydées et un facteur de risque de l'athérosclérose, et de déterminer les effets du lysoPC sur les fonctions ostéoblastiques des cellules MG-63 et des cellules MC3T3. Des mesures de calcium intracellulaire en microscopie confocale ont montré qu'à partir d'une concentration de  $20\mu\text{M}$ , la lysoPC induit une mobilisation du calcium des réserves cytoplasmiques et un influx calcique de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. La mobilisation était absente lorsque les réserves du réticulum endoplasmique (RE) ont été épuisées par la Thapsigargine, indiquant que la mobilisation provient du calcium libéré du RE. De plus, l'inhibiteur de la phospholipase C (PLC), l'U73122, a bloqué la mobilisation, suggérant que la lysoPC stimule la PLC qui entraîne par la suite la libération du calcium du RE. Par ailleurs, l'influx calcique, d'origine extracellulaire, induit par la lysoPC a été bloqué par le rouge de ruthénium (RR). Ce dernier résultat suggère l'implication des canaux calciques de la famille «vallinoid transient receptor potential» (TRPV). L'expression protéique de TRPV2 et TRPV4 a été mise en évidence par des essais d'immunolocalisation qui ont révélé leur présence au niveau des membranes plasmiques. Lors d'études portant sur l'effet de la lysoPC sur les fonctions cellulaires, des essais de viabilité cellulaire ont démontré que la lysoPC causait une mortalité des ostéoblastes, avec une  $\text{LC}_{50}$  de  $20\mu\text{M}$ . La pré-incubation des cellules en présence de RR a montré une protection partielle mettant en évidence l'implication des canaux TRPV. Par la suite, des mesures d'apoptose ont montré une augmentation significative de l'apoptose à partir de  $15\mu\text{M}$  de la lysoPC. La présence de RR dans le milieu d'incubation permettait de réduire l'apoptose induite par la lysoPC. Aussi, la présence de tranilast comme inhibiteur des canaux TRPV2 permettait de réduire la cytotoxicité induite par la lysoPC. D'autre côté, des mesures de la stimulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ont indiqué qu'une incubation des cellules avec la lysoPC stimule la production de ROS, dont l'augmentation est significative à partir de  $20\mu\text{M}$ . Toutefois, l'ajout de l'antioxydant N-actélcystéine (NAC) au milieu d'incubation n'a pas influencé la cytotoxicité induite par la lysoPC. Par ailleurs, nos expériences ont indiqué que la lysoPC n'influence pas la migration cellulaire, ni la différenciation des cellules ostéoblastiques. Ces résultats indiquent que la lysoPC est à même d'altérer la viabilité des ostéoblastes et ainsi favoriser le développement de l'ostéoporose.

Mots-clés : lysoPC, ostéoblastes, mobilisation et influx calcique, toxicité, apoptose.



## 1. PROBLÉMATIQUE

L'ostéoporose est caractérisée par une masse osseuse réduite et une architecture de l'os détériorée présentant une grande susceptibilité aux fractures. Divers facteurs peuvent favoriser l'ostéoporose parmi lesquels l'âge, la ménopause, l'hérédité, l'alimentation et le tabagisme. Après l'atteinte d'un maximum de capital osseux, le maintien de la masse osseuse est établi par un équilibre du remodelage qui est assuré par la résorption de l'os ancien par les ostéoclastes suivie par la formation d'un nouveau tissu osseux grâce aux fonctions des ostéoblastes

En plus de synthétiser la matrice extracellulaire osseuse, participant ainsi à l'ostéogenèse, les ostéoblastes ont aussi un rôle essentiel dans la régulation de l'ostéolyse par les ostéoclastes. Ainsi, la migration, la prolifération et la différenciation des cellules ostéoblastiques, en plus de la synthèse et la minéralisation de la matrice osseuse par ces cellules assurent le maintien d'une masse osseuse adéquate. Tous changements au niveau de ces fonctions ostéoblastiques sont à même d'affecter l'équilibre du métabolisme osseux et de favoriser le développement de l'ostéoporose. En plus des facteurs de risque mentionnés précédemment, il semble que les lipides et les lipoprotéines de faible densité oxydées, des facteurs généralement associés au développement de l'athérosclérose, participent au développement de l'ostéoporose en altérant le processus de formation osseuse. L'athérosclérose se développe dans la couche intima des artères. Suite à une lésion ou à une infiltration des esters de cholestérol dans ce revêtement, les dépôts lipidiques vont former des plaques et provoquer un épaississement au niveau des artères réduisant ainsi l'écoulement sanguin et menant même à leur rupture occasionnée par la formation d'un thrombus (caillot sanguin).

Parmi les facteurs de risque de l'athérosclérose, on retrouve le taux élevé du cholestérol sanguin associé aux LDL. De plus la présence de LDL modifiés, entre

autres par l'oxydation, provoque le développement d'athérome au niveau des artères. Puisque les conditions athérogéniques et les LDL oxydées ont été identifiées comme des facteurs associés au développement de l'ostéoporose, il est nécessaire d'effectuer des études expérimentales sur différentes lignées ostéoblastiques afin de vérifier et d'élucider les mécanismes par lesquels les LDL oxydés altèrent les fonctions et la différenciation des cellules ostéoblastiques.

La lysophosphatidylcholine (lysoPC) est une des composantes des LDL oxydés et un facteur de risque de l'athérosclérose. Des études ont révélé que la lysoPC se lie à un récepteur transmembranaire couplé à une protéine G qui active une phospholipase C. Suite à l'hydrolyse du phosphatidylinositol bisphosphate par la phospholipase C, la cascade de signalisation qui est enclenchée mènera à l'activation de protéines kinases, modulant ainsi plusieurs fonctions cellulaires. Divers études ont rapporté que la lysoPC active des canaux ioniques de la famille «transient receptor potential» (TRP), tels TRPV2, TRPC5 et TRPC6, et modulent ainsi la migration des cellules de prostate cancéreuses et des cellules endothéliales.

Les canaux TRP représentent une grande famille de canaux ioniques répartie en 7 sous-familles selon les homologies de leurs séquences en acides aminés. Ils jouent un rôle important dans la détection de l'information extracellulaire et sont perméables aux cations tel le calcium. Parmi ceux-ci, les canaux «transient receptor potential vallinoid» (TRPV) forment une sous-famille de six membres : TRPV1 à TRPV6.

Comme le rôle des ostéoblastes est primordial dans le remaniement du tissu osseux, le but de cette étude était de déterminer les effets de la lysoPC sur la viabilité, la prolifération, la migration et la différenciation des ostéoblastes, ainsi que de déterminer l'importance du calcium dans la voie de signalisation induite par la lysoPC. Ce projet visait ainsi à clarifier les mécanismes d'action de la lysoPC, un facteur athérogène, sur le tissu osseux et servir à des études ultérieures pour documenter davantage le lien entre l'athérosclérose et l'ostéoporose.

## 2. ETATS DES CONNAISSANCES

### 2.1 Le tissu osseux

Le squelette humain est constitué de plus de 200 os correspondant à 20% de la masse corporelle. Il possède plusieurs fonctions mécaniques. Il est le support du corps, le lieu d'attachement des muscles et des tendons assurant ainsi le mouvement. Il est important pour la survie durant l'évolution, et assure une protection des organes internes. En plus, il possède des fonctions d'homéostasie dont le maintien de l'équilibre et de la distribution selon les besoins de certains minéraux comme le calcium. Il assure aussi des fonctions hématopoïétiques grâce à la moelle osseuse en fournissant des lignées cellulaires sanguines et en étant l'endroit de résidence de plusieurs cellules souches pluripotentes dotées du pouvoir de différenciation en différents types cellulaires comme des adipocytes ou des chondrocytes (Mackiewicz *et al.*, 2011).

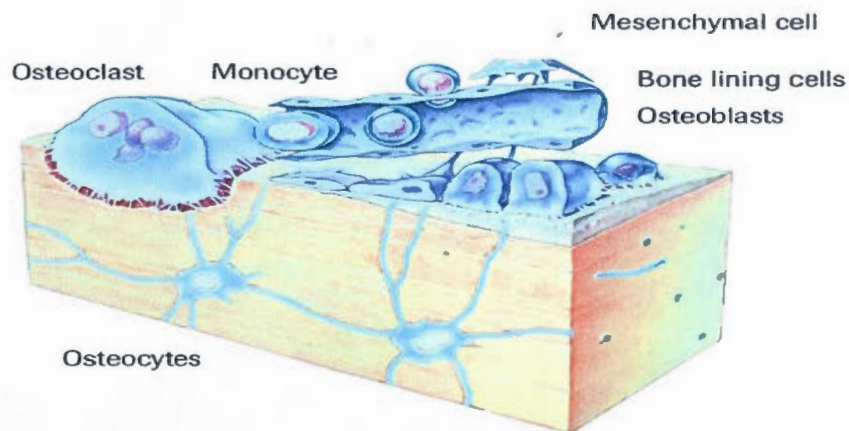
#### 2.1.1 La matrice osseuse

C'est une matrice extracellulaire caractéristique du tissu osseux formée d'une partie organique et d'une partie minérale. En effet, ce sont les ostéoblastes qui vont participer activement à la formation de la matrice osseuse (l'ostéoïde) en produisant des protéines essentielles pour sa formation et vont assurer la minéralisation osseuse. L'ostéoïde est constitué de fibrilles de collagène de type I assurant une rigidité à l'os; on y trouve aussi des glycoprotéines et des ions inorganiques. Elle contient diverses protéines non collagéniques telles la sialoprotéine pouvant se lier aux différents constituants de la matrice, l'ostéocalcine, la thrombospondine qui assure l'attachement des cellules à la matrice osseuse, l'ostéopontine et l'ostéonectine qui sont des glycoprotéines adhésives retrouvées dans la matrice osseuse minéralisée (Pivodova *et al.*, 2011). De plus, plusieurs produits comme des facteurs de croissance et des cytokines, sécrétés par les ostéoblastes, sont entreposés dans la matrice osseuse

et vont jouer, une fois libérés lors de la résorption, un rôle dans la régulation du remodelage osseux. La minéralisation de la matrice osseuse débute suite à une augmentation des concentrations locales d'ions de calcium et de phosphate et ceci grâce à la liaison de l'ostéocalcine avec les ions de calcium extracellulaires et à des vésicules matricielles, produites par les ostéoblastes, riches en calcium, en phosphate et en pyrophosphatases. Il y aura alors la formation de dépôts de phosphate de calcium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) arrangés en position parallèle avec les fibres de collagène conférant une résistance maximale contre les forces compressives (Ganss *et al.*, 1999).

### 2.1.2 Les cellules osseuses

Le tissu osseux est dynamique et vivant, en perpétuel renouvellement grâce à un travail coopératif entre ses cellules constitutives: les cellules ostéoprogénitrices et les ostéoblastes qui synthétisent le nouveau tissu osseux alors que les ostéoclastes résorbent l'ancien tissu osseux (Figure 2.1).



**Figure 2.1. Les cellules osseuses.** Les cellules ostéogéniques d'origine mésenchymateuse vont se différencier en ostéoblastes, cellules formatrices de l'os ; ces dernières, en s'entourant de matrice osseuse, vont se transformer en ostéocytes, cellules maintenant l'homéostasie du tissu osseux. Les ostéoclastes, provenant des cellules souches hématopoïétiques de type monocyte, participent à l'ostéolyse. Les cellules bordantes sont des ostéoblastes en repos. Tirée de [www.roche.com](http://www.roche.com).



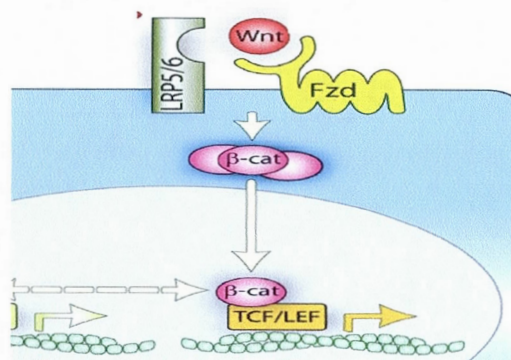
### 2.1.3 Les cellules ostéoprogénitrices

Les cellules ostéoprogénitrices sont des cellules souches capables de se diviser et de se différencier en adipocytes, chondrocytes, myocytes (Lian & Stein, 1992), mais surtout en cellules pré-ostéoblastiques. Ceci est sous l'effet de Runx 2, un facteur de transcription essentiel dans la formation osseuse et la différenciation ostéoblastique qui lie l'élément spécifique de l'ostéoblaste 2 (OSE2) présent dans le promoteur du gène de l'ostéocalcine (Fujita *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2012) et des protéines morphogénétiques osseuses (BMP), surtout BMP 2 et BMP 4. Ils sont des facteurs de croissance qui induisent la formation osseuse et la différenciation des ostéoblastes (Canalis *et al.*, 2003; Sykaras & Opperman, 2003).

### 2.1.4 Les ostéoblastes

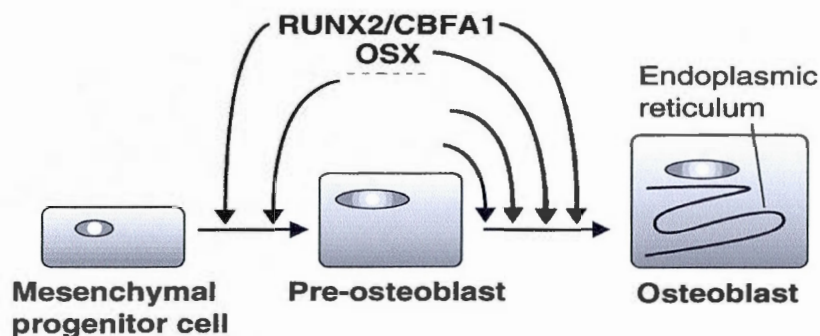
Les ostéoblastes sont des cellules mononucléées qui assurent la formation du tissu osseux. Ils jouent un rôle important dans la synthèse de la matrice, le remodelage osseux et dans le maintien de l'architecture squelettique (Sykaras & Opperman, 2003). La différenciation des ostéoblastes est principalement régulée par la voie «wingless-integration site» (Wnt) (Figure 2.2).

La Wnt, une glycoprotéine sécrétée qui est importante pour le développement et le renouvellement de nombreux tissus comme le tissu osseux, active chez les ostéoblastes une voie de signalisation canonique agissant sur la protéine  $\beta$ -caténine, en augmentant son accumulation dans le cytosol. Le Wnt se lie aux récepteurs «frizzled» (fzd) et LRP5/6, « LDL receptor-related proteins 5 and 6 ». Ceci va augmenter le niveau de  $\beta$ -caténine qui va agir comme facteur de transcription régulant ainsi la différenciation des ostéoblastes assurant ainsi une formation du tissu osseux au niveau des sites de résorption (Caetano-Lopes *et al.*, 2007).



**Figure 2.2.** La voie de signalisation activée par Wnt. Le Wnt active chez les ostéoblastes une voie de signalisation canonique agissant sur la protéine  $\beta$ -caténine en se liant aux récepteurs fzd et LRP5/6 et interagissant avec le facteur des cellules T (TCF) pour stimuler l'expression des gènes cibles. Tirée de <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/13/16/4660/F2.expansion>.

Sous l'effet d'ostérix (Figure 2.3), un facteur de transcription essentiel pour l'ostéoblastogenèse, les cellules pré-ostéoblastiques vont devenir des cellules ostéoblastiques matures. Riches en organites cellulaires, elles synthétisent la matrice organique et participent à sa minéralisation (Datta *et al.*, 2008).



**Figure 2.3.** Les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des ostéoblastes. Le Runx2 (aussi appelé CBFA1) et l'ostérix (OSX) sont deux facteurs de transcription responsables de la différenciation ostéoblastique. La Runx2 assure la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules pré-ostéoblastes alors que l'osx agit sur la différenciation des pré-osteoblastes en ostéoblastes matures. (Stains & Civitelli, 2003).

Les ostéoblastes communiquent avec les autres cellules, comme les ostéocytes, grâce à des jonctions canaliculaires et sont caractérisés par différents marqueurs de

différenciation comme la phosphatase alcaline qui joue un rôle important dans la minéralisation de la matrice extracellulaire et l'ostéocalcine qui se lie au calcium pour favoriser la minéralisation. (Stains & Civitelli, 2003). Les ostéoblastes secrètent des facteurs activateurs comme les interleukines (IL-1 et IL-6) ou inhibiteurs (l'ostéoprotégérine) des ostéoclastes selon le besoin, influençant ainsi la différenciation ostéoclastique et contrôlant par la suite la résorption osseuse. Le rôle des ostéoblastes dans la différenciation ostéoclastique est discuté dans la section suivante. A la fin de la formation osseuse, les ostéoblastes se transforment en cellules bordantes inactives pouvant être activées selon le besoin ou bien se transformer en d'autres types cellulaires comme les ostéocytes ou mourir par apoptose (Orimo, 2010; Vandrovcova & Bacakova, 2011).

#### 2.1.4 Les ostéocytes

les ostéocytes sont des cellules ostéoblastiques pleinement différenciées qui se retrouvent entourées complètement par la matrice osseuse. Leur membrane plasmique émette des prolongements cytoplasmiques leur permettant ainsi de communiquer avec les ostéoblastes à la surface de l'os en formation. (Civitelli, 2008). Ils constituent la majorité des cellules formant le tissu osseux et possèdent une durée de vie allant jusqu'à 50 ans. Suite à un stress mécanique ou une fracture, les ostéocytes, qui sont des cellules mécano-sensitives, captent et envoient des signaux aux cellules bordantes à la surface de l'os grâce à leurs extensions dendritiques pour initier le début du remodelage osseux ou aux ostéoclastes pour initier la dégradation osseuse (Bonewald & Johnson, 2008). Ils présentent moins d'organites cellulaires que les ostéoblastes. Ils participent aussi à l'homéostasie du tissu osseux et présentent des marqueurs spécifiques dont la sclérostine. Cette dernière est exprimée fortement chez les ostéocytes et joue un rôle de régulation négative dans la formation osseuse puisque la mutation du gène *SOST*, codant pour la sclérostine, provoque une augmentation de la masse osseuse. La sclérostine agit comme un antagoniste à l'action de Lrp5, un activateur de la voie de signalisation de Wnt/ $\beta$ Caténine (Dallas & Bonewald, 2010)

### 2.1.5 Les ostéoclastes

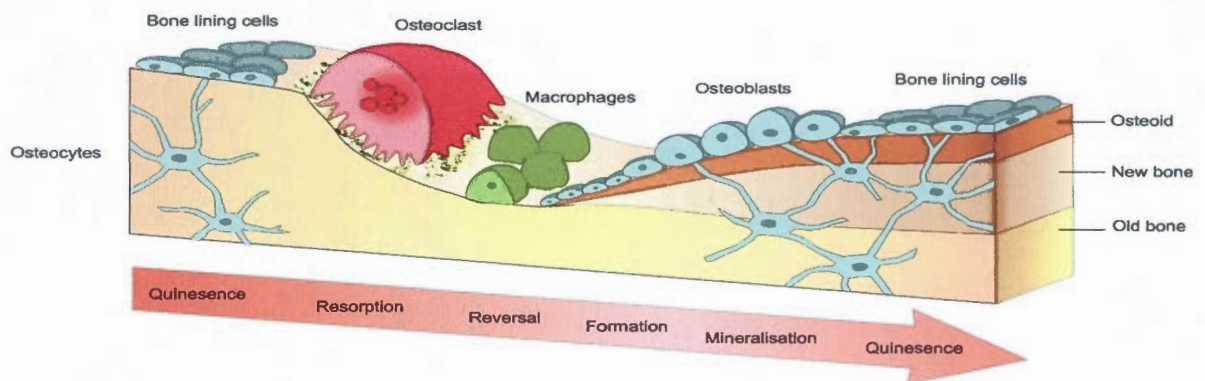
Les ostéoclastes sont des cellules ovales de grande taille multinucléées formées par la fusion de plusieurs monocytes et riches en organites. Ce sont des cellules spécialisées pour la résorption de la matrice osseuse et ils jouent un rôle très important dans la régulation de la formation d'un tissu osseux en agissant sur les fonctions ostéoblastiques comme la formation de la matrice osseuse et sa minéralisation (Duplomb *et al.*, 2007). Sous l'effet de PU.1, un facteur de transcription, les pré-ostéoclastes vont exprimer le récepteur du «macrophage colony stimulating factor» (M-CSF) qui est le CSF1R; ceci est une phase importante dans la différenciation ostéoclastique (expliquée dans la section suivante) (Yavropoulou & Yovos, 2008). Présentant une bordure en brosse ondulante à replis profonds, la membrane plasmique des ostéoclastes, en contact avec le tissu osseux, délimite un microenvironnement scellé établissant un lieu dont le pH est acide grâce à l'activité de pompes à protons au niveau de cette bordure. Ainsi, l'ostéoclaste va pouvoir dissoudre les cristaux d'hydroxyapatite de la matrice minérale. En plus, les ostéoclastes vont produire et sécréter dans ce microenvironnement des enzymes lysosomales pour assurer la dégradation de la matrice organique (Bar-Shavit, 2007; Mellis *et al.*, 2011). Leur activité est régulée par les ostéoblastes et ce processus est décrit à la section suivante. Parmi les marqueurs de différenciation, on trouve l'expression de la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) et la cathepsine k qui vont dégrader la matrice osseuse organique (Suda & Takahashi, 2008).

### 2.2 Le remodelage osseux

Le tissu osseux est vivant et dynamique, étant dans un état de remaniement continu qui permet à l'os de se régénérer lors des fractures et de s'adapter aux contraintes mécaniques. Dès la naissance, le tissu osseux est en modelage, un processus par lequel les os changent de forme en réponse à des influences physiologiques, où l'ostéogenèse est supérieure à l'ostéolyse jusqu'au début de la vingtaine. Après le



modelage, c'est le remodelage osseux qui prend la relève. Il est la résultante de la coopération des ostéoclastes et des ostéoblastes par la formation de nombreuses unités fonctionnelles de remodelage mobiles qui vont assurer respectivement la résorption de l'ancien tissu suivie par la genèse d'un nouveau tissu entraînant un équilibre pour un certain temps de la masse osseuse chez les adultes sains. Le remodelage comprend 4 phases: la phase d'activation, la phase de résorption, la phase d'inversion et la phase de formation (Figure 2.4) (Brandi, 2009; Eriksen, 2010).



**Figure 2.4. Le remodelage osseux.** Durant la phase d'activation, les pré-ostéoclastes, sous l'action des facteurs sécrétés par les ostéoblastes, se différencient en ostéoclastes matures assurant ainsi la phase de résorption de la matrice osseuse. Durant la phase d'inversion, les ostéoclastes meurent par apoptose et sont remplacés par des macrophages qui lissent la partie résorbée. La phase de formation est caractérisée par la sécrétion de l'ostéoïde, et sa minéralisation par les ostéoblastes. La phase de quiescence est une phase de repos et d'inactivité. Tirée de [www.surgeongeneral.gov/library/bonehealth/chapter\\_2.html](http://www.surgeongeneral.gov/library/bonehealth/chapter_2.html).

### 2.2.1 La phase d'activation

Diverses cytokines comme les interleukines 1 et 6 (IL-1 $\beta$ , IL-6) et le «tumor necrosis factor  $\alpha$ » (TNF- $\alpha$ ) présentent un effet positif sur l'ostéoclastogénèse en induisant les ostéoblastes à sécréter le M-CSF qui va assurer la prolifération et la différenciation des pré-ostéoclastes (Cohen-Solal & de Vernejoul, 2002). En effet, le facteur de transcription PU.1 est responsable de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en monocytes précurseurs des ostéoclastes. Le M-CSF augmente

l'expression du «receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B» (RANK) à la surface des pré-ostéoclastes suite à l'activation des facteurs de transcription comme c-fos. (Yavropoulou & Yovos, 2008). Les ostéoblastes participent aussi activement à l'activation des ostéoclastes grâce à un travail coopératif de trois molécules qui sont le facteur de différenciation de l'ostéoclaste (ODF) aussi désigné «receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand» (RANKL), qui est un récepteur membranaire des ostéoblastes, l'ostéoprotégérine (OPG) sécrétée par les ostéoblastes et le récepteur membranaire des pré-ostéoclastes RANK (Tsourdi *et al.*, 2011). L'OPG assure un contrôle négatif sur la résorption par les ostéoclastes en se liant à l'ODF tandis que la liaison entre RANK et ODF stimule leur activité (Boyce *et al.*, 2009; Gurban & Mederle, 2011). Divers facteurs stimulent la phase d'activation afin d'augmenter l'activité de dégradation des ostéoclastes amenant à l'augmentation du taux sérique du calcium. Ainsi l'IL-1, l'IL-6 et l'hormone parathyroïdienne (PTH) agissent sur les ostéoblastes pour induire l'expression de l'ODF alors que d'autres facteurs, sécrétés en réponse à une hypercalcémie, l'inhibent comme la calcitonine (Mellis *et al.*, 2011).

### 2.2.2 La phase de résorption

L'ostéoclaste actif dégrade l'os tout au long de son déplacement sur la surface osseuse endommagée. Il sécrète des protons au sein d'un microenvironnement scellé rendant cet espace acide, ce qui favorise la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite. L'ostéoclaste libère aussi des protéases lysosomales comme la TRAP, la cathepsine K, Oscar, DC-Stamp, la métalloprotéinase 9 et la gélatinase qui vont hydrolyser les composants organiques de la matrice (Clarke, 2008; Mellis *et al.*, 2011).

### 2.2.3 La phase d'inversion

Les ostéoclastes meurent par apoptose et sont remplacés par les macrophages qui vont lisser la partie résorbée afin de préparer la surface et pour donner le relais aux ostéoblastes qui vont migrer vers le site de résorption osseux pour commencer

l'initialisation de la formation d'un nouveau tissu osseux (Hadjidakis & Androulakis, 2006).

#### 2.2.4 La phase de formation du tissu osseux

Les ostéoblastes sont responsables de la formation du nouveau tissu osseux en produisant la nouvelle matrice osseuse organique et en assurant sa minéralisation (Gay *et al.*, 2000). Les ostéoblastes matures, riches en réticulum endoplasmique, synthétisent la nouvelle matrice ou l'ostéoïde sous l'influence de plusieurs hormones comme l'œstrogène et des facteurs de croissance comme le facteur de transformation cellulaire  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (Khajuria *et al.*, 2011).

En effet, l'œstrogène induit l'expression de l'ostéocalcine ainsi que l'expression de la phosphatase alcaline, deux protéines participant à la minéralisation de la matrice osseuse; l'ostéoblaste va exprimer davantage ces marqueurs de différenciation qui vont causer la formation des cristaux d'hydroxyapatite faisant de l'os un réservoir très riche en phosphate et surtout en calcium (Das, 2002). La vitamine D<sub>3</sub> (calcitriol) assure aussi l'absorption du calcium au niveau intestinal, ce qui assure l'approvisionnement en calcium pour la formation osseuse (Stojanovic *et al.*, 2011).

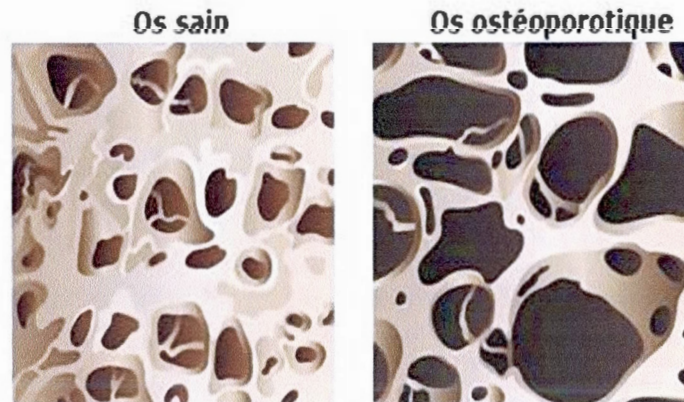
#### 2.3 L'ostéoporose

Le tissu osseux est composé de différents types cellulaires qui assurent un renouvellement continu de celui-ci; ce processus est en équilibre grâce à l'ostéolyse suivie par une ostéogenèse. Chez la femme ménopausée, l'ostéolyse s'accroît (Tanko *et al.*, 2005), provoquant ainsi une maladie chronique observable aussi chez l'homme mais d'une façon moins sévère et avec une prévalence des fractures moindre puisque la diminution des androgènes est plus graduelle et plus lente chez l'homme à partir de l'âge de 55 ans. Un déséquilibre vers l'ostéolyse mène à l'ostéoporose. cette maladie silencieuse se manifeste par une diminution de la densité du capital osseux et une atteinte au niveau de l'architecture du tissu osseux (Figure 2.5). Ceci va entraîner une

faiblesse osseuse rendant l'os plus susceptible aux fractures (Cawthon, 2011). L'augmentation de la porosité va donc diminuer la capacité du tissu osseux à résister aux contraintes mécaniques que le corps subit. Durant la croissance, l'élaboration du nouveau tissu est supérieure à la destruction jusqu'à l'atteinte d'une densité osseuse maximale à l'âge de 30 à 35 ans, caractérisée par un équilibre de formation et de résorption de la masse osseuse.

Cette période de l'âge adulte est caractérisée par un remodelage osseux stable. Elle est suivie par une diminution accélérée de la densité osseuse après la ménopause chez la femme à cause d'une diminution importante de l'œstrogène (Gates *et al.*, 2009).

Si le capital de la densité de la masse osseuse maximale est faible depuis la jeunesse ou qu'il y a présence de facteurs de risque, une ostéoporose va se développer par la résorption exacerbée du tissu osseux causant des anomalies dans l'architecture de l'os (Gates *et al.*, 2009).



**Figure 2.5.** Représentation de la portion trabéculaire d'un os sain et d'un os présentant de l'ostéoporose. L'ostéoporose provoque une diminution et une détérioration de la microarchitecture osseuse. La diminution des trabécules entraîne une augmentation de la porosité de l'os et de l'incidence des fractures (Tirée de <http://www.migesplus.ch/pdf/538.pdf>).

Plusieurs facteurs de risque du développement de l'ostéoporose ont été identifiés : l'hérédité, l'âge, la ménopause, les affections endocriniennes, une carence nutritionnelle en calcium et en vitamine D, le tabagisme, l'alcoolisme et une masse



osseuse maximale de faible densité dès l'enfance (Sweet *et al.*, 2009). L'extrémité supérieure du fémur, les vertèbres, les poignets sont les principaux sites de fractures provoquées par l'ostéoporose. D'autres fractures comme celles du col de l'humérus, du bassin et de l'extrémité supérieure du tibia ont aussi une forte incidence dans le cas de faible masse osseuse (Harvey *et al.*, 2010). Plusieurs traitements sont utilisés pour traiter l'ostéoporose, parmi lesquels les bisphosphonates qui s'insèrent dans la matrice osseuse lors de la minéralisation et la rendent réfractaire à la résorption osseuse par les ostéoclastes, réduisant ainsi l'incidence des fractures. L'oestrogène, aussi, stimule la production d'OPG des ostéoblastes exerçant une retro-action négative sur l'activation des ostéoclastes. La PTH, dont l'administration intermittente, favorise une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoblastes (Borba & Manas, 2010; Khajuria *et al.*, 2011). L'ostéoporose est une maladie silencieuse mais peut être accompagnée par une autre complication physiologie comme l'athérosclérose. En effet, des études épidémiologiques montrent que les femmes présentant une densité osseuse basse ont une augmentation de 22 % jusqu'à 40% des maladies cardiovasculaires (Recke *et al.*, 1999; Reyes-Garcia *et al.*, 2011)

L'ostéoporose et l'athérosclérose ne sont pas seulement bien répandues dans la population âgée mais présentent aussi des liens physiologiques. Chez les patients qui présentent l'athérosclérose, il ya apparition de l'expression des protéines comme ostéopontine, ostéonectine et ostéocalcine au niveau des cellules de l'aorte et d'une calcification au niveau de la paroi. Normalement, ces protéines ne sont pas exprimées au niveau des vaisseaux mais leur expression est importante au niveau du tissu osseux. Ainsi, le processus de calcification vasculaire partage des similitudes avec celui du métabolisme osseux (Hamerman, 2005). D'après les travaux de Parhami *et al.*, les souris C57BL/6, souris susceptibles génétiquement à l'athérosclérose, exposées à une nourriture riche en lipides athérogènes pendant 7 mois, présentent une diminution de la densité osseuse fémorale de 43%, de la densité minérale de 15% et une expression génique par les cultures primaires d'ostéoblastes réduite de 35% pour

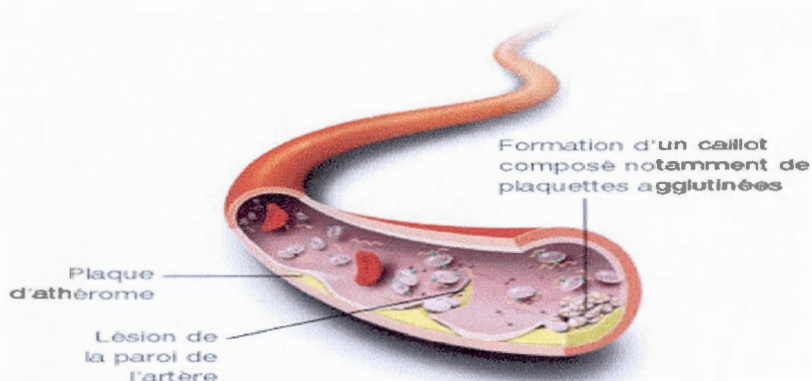
l'ostéocalcine, un marqueur de différenciation ostéoblastique (Parhami *et al.*, 2001). Aussi, la différenciation en ostéoblastes des cellules mésenchymateuses ostéoprogénitrices murines M2-10B4 est inhibée sous l'effet des lipoprotéines de faible densité faiblement oxydés (MM-LDL) alors que les MM-LDL favorisent la différenciation des M2-10B4 en adipocytes (Parhami *et al.*, 1999). Une autre étude montre que l'augmentation des LDL, qui vont assurer le transport du cholestérol synthétisé par le foie vers les tissus, et la diminution des lipoprotéines de haute densité (HDL), qui vont assurer le transport du cholestérol des tissus vers le foie, sont associées à une densité osseuse minérale basse chez les femmes ménopausées (Kawate & Takayanagi, 2011). D'après des études *in vitro*, les produits lipidiques libérés suite à l'oxydation des lipoprotéines de faible densité peuvent aussi participer au développement de l'ostéoporose en réduisant la minéralisation de la matrice osseuse et en inhibant la différenciation ostéoblastique ; leurs rôles néanmoins demeurent incertains (Parhami *et al.*, 2000). Le traitement des cellules ostéoblastiques MG-63 avec des concentrations de LDL oxydées supérieures à 50µM induisent la mortalité ostéoblastique par apoptose (Brodeur *et al.*, 2008a; Hamel *et al.*, 2008). De plus, les LDL oxydées sont internalisées, provoquent aussi un dommage au niveau de la membrane lysosomiale et occasionnent une hyperpolarisation mitochondriale induisant ainsi l'augmentation de la production du ROS. Aussi, les LDL oxydées réduisent l'activité de la phosphatase alcaline et la migration cellulaire (Hamel *et al.*, 2008). En plus, les LDL, incubés avec les ostéoblastes, deviennent oxydés (Brodeur *et al.*, 2008b).

#### 2.4 L'athérosclérose

L'athérosclérose est à l'origine de nombreuses maladies cardiovasculaires, parmi lesquelles la crise cardiaque. Ces maladies sont la première cause de décès mondial allant approximativement jusqu'à 30%. Plusieurs hypothèses ont été formulées afin d'expliquer le processus par lequel se développe l'athérosclérose. Dernièrement, la plupart des études se concentrent autour de la théorie inflammatoire qui suggère que

l'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des artères induite par l'accumulation des LDL modifiés, des cellules inflammatoires comme les macrophages et le dépôt de tissu fibreux (Figure 2.6) (Mizuno *et al.*, 2011). L'âge, le genre masculin, l'hérédité, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, le diabète de type II, le tabagisme, la sédentarité, le stress et l'obésité sont tous des facteurs de risque de l'athérosclérose (Hong, 2010). Plusieurs études affirment que les LDL oxydés ont un rôle athérogène principal (Badimon *et al.*, 2009). L'oxydation des LDL, après leur pénétration dans la couche intima des artères de gros et de moyen calibre, va recruter les macrophages qui traversent l'endothélium suite à leur activation par des cellules endothéliales. En effet, la formation de la plaque d'athérome débute par l'activation des cellules endothéliales entraînant une surexpression des protéines impliquées dans le recrutement des monocytes au niveau de la lésion où ils vont se différencier en macrophages suite à l'expression du M-CSF (Mizuno *et al.*, 2011).

Suite à la libération de médiateurs inflammatoires, les macrophages vont exprimer les «scavenger receptors» qui assurent la reconnaissance de l'apolipoprotéine B, une protéine associée aux LDL. Ces récepteurs vont faciliter l'internalisation des LDL oxydées, ce qui va entraîner la formation de cellules spumeuses riches en esters de cholestérol et ainsi stimuler la sécrétion des produits inflammatoires comme TNF $\alpha$  et IL-1 (Ramsey *et al.*, 2010). Les cellules musculaires lisses adjacentes vont proliférer et migrer au niveau de la lésion dans l'intima. L'accumulation et l'adhésion du noyau lipidique avec la paroi vasculaire va former la plaque d'athérome dont la rupture provoque la formation ultérieure du thrombus (Libby *et al.*, 2009). L'épaississement au niveau des artères augmente la résistance au flux sanguin menant ainsi à une hypertension et à des troubles cardiaques (Figure 2.6).



**Figure 2.6. Le développement de l'athérosclérose.** L'altération de la paroi artérielle suite à une lésion permet la pénétration des LDL oxydés. Les dépôts d'esters de cholestérol vont conduire à la formation de la plaque d'athérome dont la rupture provoque la formation du thrombus (Tirée de <http://www.nsfra.asso.fr/spip.php.article98>)

## 2.5 Les LDL oxydées

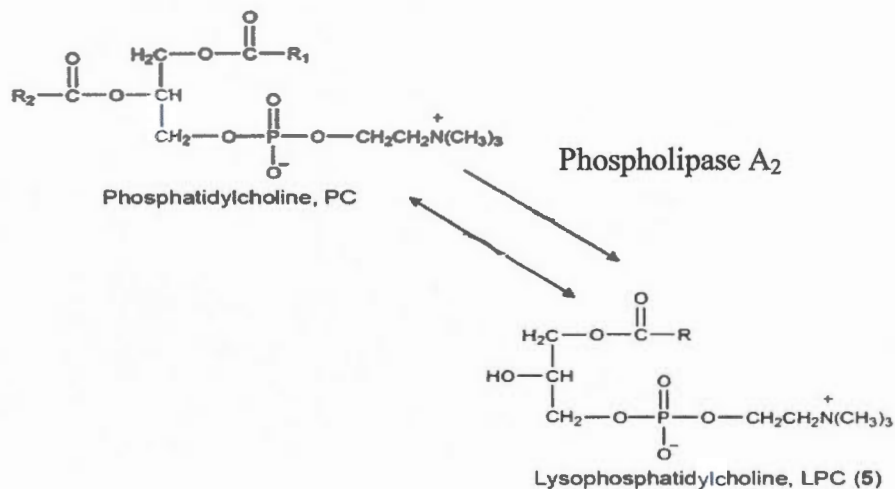
Les MM-LDL, des déterminants athérogènes, inhibent la différenciation des ostéoblastes alors qu'ils induisent la différenciation des ostéoclastes (Danilevicius *et al.*, 2007; Graham *et al.*, 2009). Bien que des études indiquent que ces lipoprotéines oxydées induisent la différenciation ostéoblastique dans les cellules vasculaires alors qu'elles inhibent leur différenciation dans les tissu osseux, les mécanismes demeurent largement inconnus (Demer & Tintut, 2011). L'oxydation des LDL par l'action enzymatique de la phospholipase A<sub>2</sub>, entre autres, provoque la libération de la lysoPC, un composant présent ainsi au niveau des plaques d'athérome et responsable des effets majeurs des LDL oxydées (Colles & Chisolm, 2000). L'identification des effets de la lysoPC sur les différentes fonctions des ostéoblastes permettrait de mieux comprendre les effets néfastes des LDL oxydés sur le métabolisme osseux.

## 2.6 Propriétés biochimiques de la lysoPC

Les glycérophospholipides sont des constituants lipidiques membranaires dont le squelette, le glycérol, est lié à 2 acides gras par des liaisons ester, un acide gras saturé



en position 1 et un acide gras insaturé en position 2, et présentant en position 3 un groupement phosphate estérifié constituant la tête polaire hydrophile (Figure 2.7) (Garrett & Grisham, 2000).



**Figure 2.7. Formation de la lysoPC.** A partir de la phosphatidylcholine et sous l'effet enzymatique de la phospholipase A<sub>2</sub>, il y a la libération de la lysophosphatidylcholine. Tirée de (Zheng *et al.*, 2012)

Ces phospholipides font aussi partie de la couche externe des LDL, ayant l'extrémité hydrophile orientée vers l'extérieur. Plusieurs produits lipidiques vont être libérés lors de l'oxydation ou la modification enzymatique des LDL ainsi que la dégradation des phospholipides.

La lysoPC est un lipide dérivé de la dégradation de la phosphatidylcholine par l'action enzymatique d'hydrolyse d'une phospholipase A<sub>2</sub>. La phosphatidylcholine est un phosphoglycéride ayant la choline comme groupe de tête et présentant un groupe amine chargé positivement (Choi *et al.*, 2011; Takenouchi *et al.*, 2007). Elle est présente d'une façon importante lors de l'infiltration des cellules inflammatoires et le dépôt de la plaque d'athérome jouant un rôle important dans le développement de l'athérosclérose. La lysoPC est produite aussi au niveau des membranes cellulaires en de faibles concentrations. Elle est impliquée dans le cycle de la phosphatidylcholine suite à l'action de la phospholipase A<sub>2</sub> au niveau intracellulaire et assure ainsi la

régulation de plusieurs fonctions de différents types cellulaires (Colles & Chisolm, 2000). En agissant de façon extracellulaire, la lysoPC active l'adénylate cyclase en se liant à un récepteur associé à la stimulation de protéines G trimériques de la famille  $G_{\alpha s}$  dans les plaquettes (Ding *et al.*, 2011). Ainsi, elle induit la prolifération des cellules musculaires lisses des artères (Chai *et al.*, 1996) et stimule l'attraction des monocytes humains (Quinn *et al.*, 1988). De plus, elle inhibe la migration des cellules endothéliales (Chaudhuri *et al.*, 2008).

La lysoPC stimule l'entrée (influx) calcique suite à l'activation de la protéine kinase C dans les cellules musculaires lisses (Jung *et al.*, 2008). Elle induit l'expression des gènes ostéogéniques dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux (Vickers *et al.*, 2010) et stimule la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  dans les microglies (Stock *et al.*, 2006). En plus, la lysoPC active la caspase-3, induisant ainsi l'apoptose des cellules endothéliales (Park *et al.*, 2010). A des concentrations élevées, la lysoPC possède des propriétés de détergeant causant la lyse des cellules suite à la perforation de leur membrane plasmique (Colles & Chisolm, 2000). La lysoPC est capable d'induire la production de ROS dans les cellules gliales via l'activité de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH oxydase) tandis que l'inhibition des canaux TRPV1 diminue complètement la production de ROS (Schilling & Eder, 2010a). La lysoPC induit la production de ROS mitochondriaux suivant un processus dépendant du calcium qui active la voie des « Extracellular signal-regulated kinases (ERK)/ Mitogen-activated protein kinases (MAPK) » (Watanabe *et al.*, 2006).

## 2.7 La voie de signalisation induite par la lysoPC

D'après plusieurs articles, l'effet de la lysoPC sur les diverses fonctions cellulaires implique l'activation de certains récepteurs couplés à une protéine G (Radu *et al.*, 2004). Divers récepteurs de la lysoPC ont été identifiés tels les récepteurs G2A, OGR1 et GPR4 (Frick *et al.*, 2009). La lysoPC se lie à son récepteur G2A dans les neutrophiles augmentant ainsi la concentration cytosolique du calcium et activant des

protéines comme la clathrine et l'arrestine  $\beta$ -1 (propage puis arrête la transduction du signal) (Khan *et al.*, 2010). Les macrophages, les lymphocytes ainsi que les cellules fibroblastiques expriment le récepteur G2A alors que le récepteur GPR4 est exprimé par les cellules endothéliales et surexprimé par les cellules cancéreuses (Qiao *et al.*, 2006). Les récepteurs couplés à une protéine G (GPCR) représentent une grande famille de protéines dont la structure est caractérisée par la présence de 7 segments d'hélice  $\alpha$  transmembranaires, un domaine extracellulaire liant l'agoniste et un domaine intracellulaire activateur d'une protéine G spécifique assurant des effets à court terme comme l'augmentation du calcium intracellulaire ou à long terme comme la transcription de gènes (Bohme & Beck-Sickinger, 2009; Vischer *et al.*, 2011).

Les protéines G, éléments essentiels pour la transduction du signal, sont des protéines hétérotrimériques situées au niveau de la membrane plasmique et composées par une sous-unité  $\alpha$  ( $G_\alpha$ ) et par un complexe dimérique constitué de deux sous-unités, désignées  $\beta$  et  $\gamma$  ( $G_{\beta\gamma}$ ). Sous la forme inactive, les trimères de la protéine G présentent une guanosine 5'-diphosphate (GDP) liée étroitement à la sous-unité  $G_\alpha$ . La liaison entre un ligand et le récepteur couplé à une protéine G va induire un changement de conformation dans le domaine intracellulaire du récepteur permettant l'activation de la protéine G. Ainsi, la molécule de GDP se dissocie de la protéine  $G_\alpha$  et est substituée par une guanosine 5'-triphosphate (GTP) qui s'associe à la sous-unité  $G_\alpha$  grâce au changement de conformation de la protéine G.

Alors, la sous-unité  $G_\alpha$  se libère du complexe  $G_{\beta\gamma}$  et va activer ou inhiber des protéines effectrices dans la cascade de signalisation. Le dimère  $G_{\beta\gamma}$ , toujours lié au récepteur, peut aussi activer des protéines cibles, des enzymes effectrices. Après l'hydrolyse du GTP en GDP, la sous-unité  $G_\alpha$  va se complexer de nouveau avec  $G_{\beta\gamma}$  pour former l'hétérotrimère  $G_{\alpha\beta\gamma}$  inactif (Marty & Ye, 2010; Vilardaga *et al.*, 2010). La famille des sous-unités  $G_\alpha$  est répartie principalement en 4 classes :



- La classe  $G_{as}$  stimule l'adénylate cyclase, enzyme qui catalyse la formation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMP<sub>c</sub>) à partir de l'adénosine triphosphate et peut ainsi activer la protéine kinase A
- La classe  $G_{ai/o}$  contient 3 isoformes de  $G_{ai}$ , soient  $G_{ao}$ ,  $G_{agust}$  et  $G_{at}$ . La  $G_{ai}$  inhibe l'adénylate cyclase et les canaux calciques alors que les autres activent des voies de signalisation variées impliquant la phosphatidyl-inositol-3-kinase, la phospholipase C et des petites protéines G monomériques.
- La classe  $G_{aq}$  active la PLC- $\beta$
- La classe  $G_{a12/13}$  assure la régulation d'une variété de réponses cellulaires dont la prolifération et la migration (Yanamadala *et al.*, 2009). Principalement, leur fonction est d'activer la petite protéine G Rho impliquée dans la synthèse de l'ARN (Tilley, 2011) (figure 2.8).

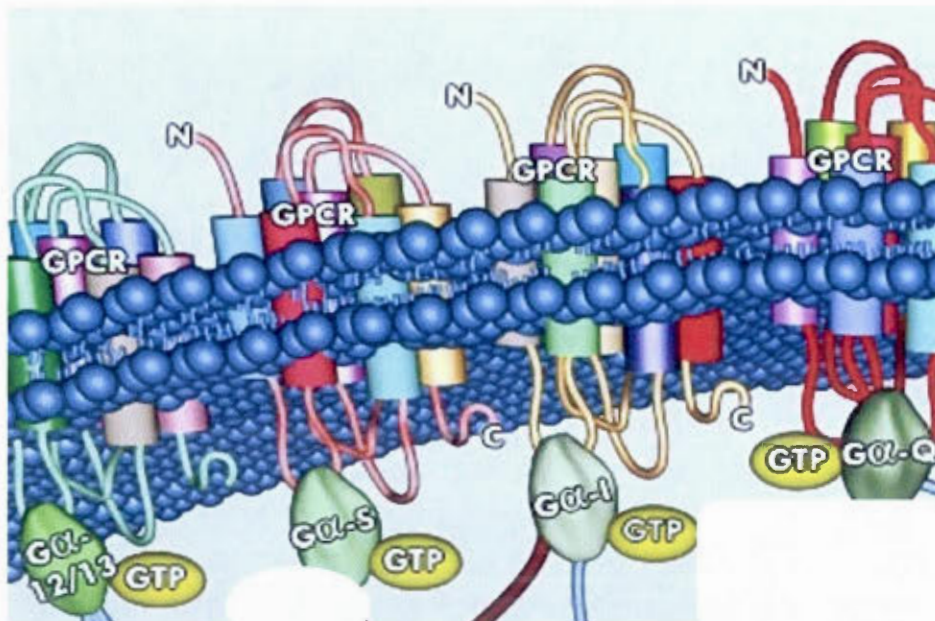
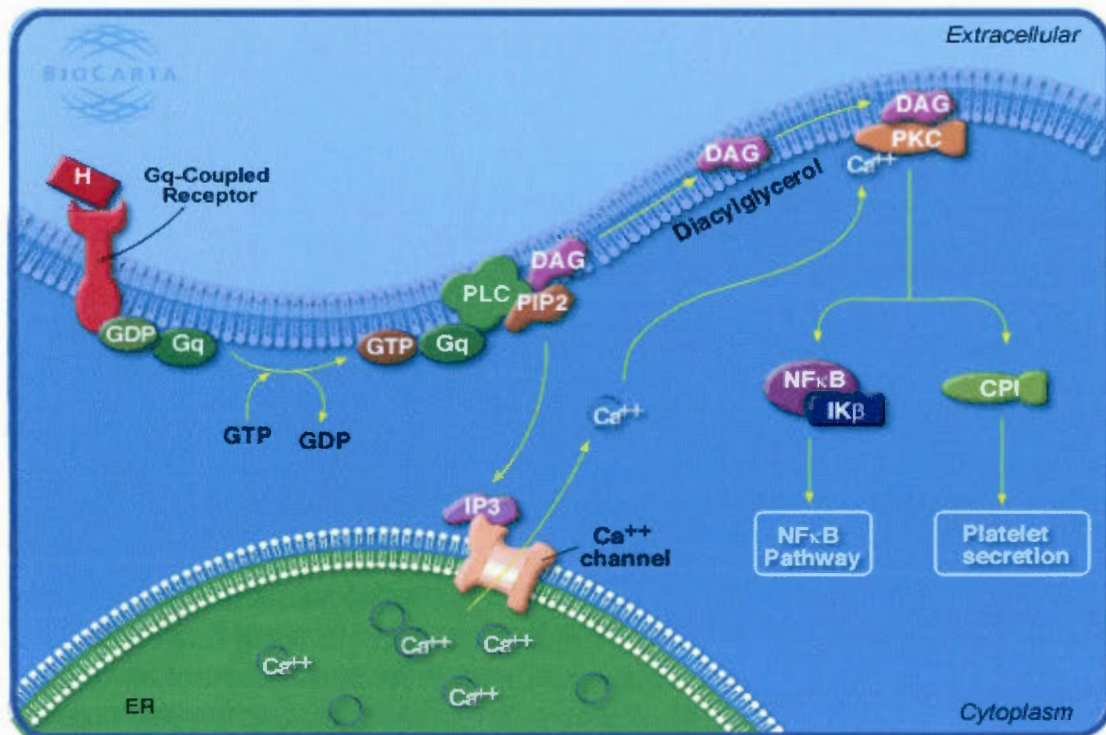


Figure 2.8. La répartition de la famille des protéines  $G_{\alpha}$ . Les différentes classes des protéines  $G_{\alpha}$  sont  $G_{ai}$ ,  $G_{as}$ ,  $G_{aq}$  et  $G_{a12/13}$ . Elles sont situées au niveau de la membrane plasmique liées à leurs récepteurs. Les protéines G se lient au GTP et l'hydrolysent en GDP afin de propager le signal intracellulaire. Tirée de [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Les phospholipases C (PLC) représentent une famille de 13 isozymes ayant des séquences similaires, répartie en six groupes en se basant sur la structure et la régulation des mécanismes d'activation : PLC- $\beta$  (1-4), PLC- $\gamma$  (1-2), PLC- $\delta$  (1-3-4), PLC- $\epsilon$ , PLC- $\zeta$  et PLC- $\eta$  (1-2) (Nakamura & Fukami, 2009). Les phospholipases C sont des enzymes solubles intervenant lors de la transduction du signal essentiellement pour l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) (Rebecchi & Pentyala, 2000).

Le PIP<sub>2</sub> et ses dérivés agissent à un certain niveau pour réguler la structure et le métabolisme cellulaires. En effet, le PIP<sub>2</sub> agit sur le transport vésiculaire, l'organisation du cytosquelette et la signalisation calcique intracellulaire. Le PIP<sub>2</sub> est inséré dans le feuillet interne de la membrane plasmique et sert aussi comme réservoir de seconds messagers assurant une cascade de signalisation intracellulaire en réponse aux signaux extracellulaires. La PLC, présente au niveau de la membrane, va hydrolyser le PIP<sub>2</sub> pour produire deux seconds messagers qui sont l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP<sub>3</sub>) libéré dans le cytosol et le diacylglycérol (DAG) qui restera lié à la membrane plasmique (Figure 2.9) (Fukami, 2002). L'IP<sub>3</sub> va se lier à son récepteur IP<sub>3</sub>R au niveau du réticulum endoplasmique et activer la libération du calcium.

La combinaison du DAG et la concentration élevée du calcium libre dans le cytosol vont activer une protéine kinase C (PKC) qui va assurer la phosphorylation de résidus spécifiques de quelques protéines comme réponse de la cellule à ce signal (Newton, 1995; Suh *et al.*, 2008). L'administration de la lysoPC assure une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux (Jung *et al.*, 2008).



**Figure 2.9. La voie de signalisation associée à  $G_{\alpha q}$ .** Le ligand lie son récepteur couplé à une protéine  $G_{\alpha q}$  qui active une phospholipase C; celle-ci va assurer l'hydrolyse du  $PIP_2$  en  $IP_3$  et DAG, seconds messagers assurant la transduction du signal (Tirée de [www.biocarta.com/pathfiles/h\\_pkcPathway](http://www.biocarta.com/pathfiles/h_pkcPathway)).

## 2.8 Le calcium

Le calcium est le cation le plus abondant dans le corps humain. Il représente le composant majeur dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires. Le calcium est très important pour la survie des cellules; il est reconnu comme un messenger intracellulaire essentiel qui accompagne les cellules durant leur durée de vie (Brini & Carafoli, 2009). Sa mobilisation intracellulaire est assurée par la liaison de l' $IP_3R$  et l' $IP_3$  qui est un médiateur ayant une action rapide qui facilite la première réponse en assurant la mobilisation du calcium intracellulaire du réticulum endoplasmique (Figure 2.10) (Cheng & Lederer, 2008). Il contribue au potentiel électrique des membranes cellulaires et est impliqué dans des processus fondamentaux comme l'activité enzymatique, la perméabilité membranaire, la neurotransmission, la



contraction musculaire et la synthèse d'ADN (Tordoff, 2001). En effet, le calcium est considéré comme un médiateur primordial de l'activité durant le cycle cellulaire mais aussi comme responsable de l'apoptose. En effet, la mort des cellules par apoptose est souvent due à une perte du contrôle homéostatique du calcium; elle est aussi modulée par des changements subtils de la distribution du calcium entre les compartiments intracellulaires (Brini & Carafoli, 2009; Cheng & Lederer, 2008). Par exemple, les lymphocytes déficients en récepteur de l' $IP_3$  sont résistants à l'apoptose. Cette résistance peut être renversée par une augmentation du calcium intracellulaire soit par un influx, soit par une mobilisation intracellulaire (Distelhorst & Dubyak, 1998). Le calcium peut activer différentes protéines responsables de l'induction de l'apoptose comme les endonucléases et les protéases (Kristian & Siesjo, 1998).

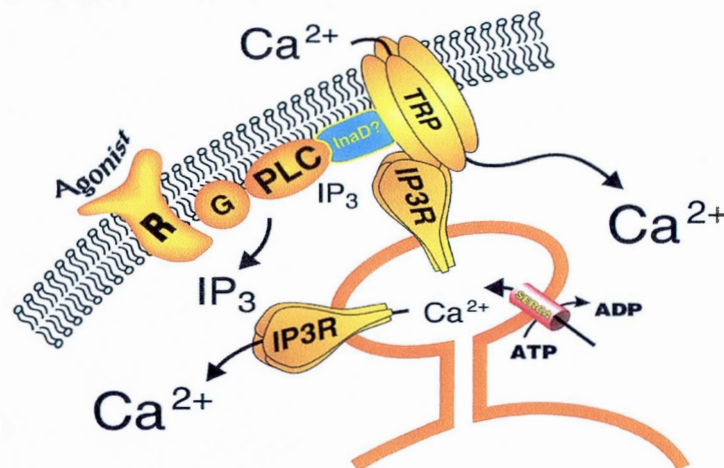


Figure 2.10. les voies de signalisations liées au calcium : le calcium entre dans la cellule via les canaux TRP causant un influx. le calcium est libéré dans la cellule à partir le reticulum endoplasmique via les pompes serca lors de la liaison de l' $IP_3$  avec son récepteur. Tirée de

La concentration intracellulaire élevée du calcium va favoriser sa liaison à la calmoduline et à la calcineurine. La calmoduline joue un rôle dans la résorption osseuse ainsi que dans la genèse cellulaire (Williams *et al.*, 2010) alors que la calcineurine, dépendante du calcium, assure la déphosphorylation du «cAMP response element-binding protein» (CREB), ( Haruhiko et al, 1996), un facteur de

transcription qui assure la régulation de la prolifération, la survie et la différenciation des macrophages et des cellules B (Wen *et al.*, 2010). Les deux, la calcineurine et la calmoduline, assurent ainsi l'activation ou l'inhibition de certaines protéines dépendantes de celles-ci ayant un rôle nécessaire pour la transduction ou l'arrêt du signal (Morales *et al.*, 2007). Il a été observé que la lysoPC stimule la migration des cellules de prostate cancéreuses suite à l'activation de TRPV2 (Monet *et al.*, 2009) alors que la lysoPC inhibe la migration des cellules endothéliales murines par l'induction d'un influx calcique via l'activation des canaux TRPC5 et TRPC6 (Chaudhuri *et al.*, 2008). Donc, l'étude de l'implication des canaux TRP, exprimés par les ostéoblastes, dans la voie de signalisation induite par la lysoPC est primordiale pour la compréhension des mécanismes d'action de la lysoPC sur le métabolisme osseux.

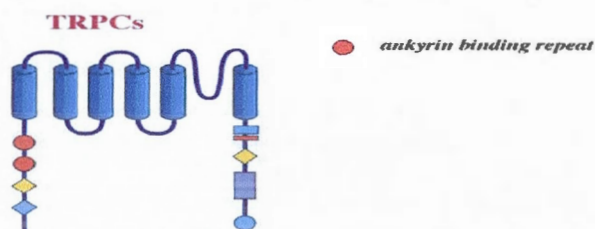
## 2.9 Les canaux TRP

Les canaux TRP constituent une large famille diversifiée de canaux protéiques cationiques non-sélectifs aidant les cellules à intégrer les informations et à détecter les changements de leur environnement. Ces canaux sont exprimés entre autres dans les hépatocytes, dans les cellules du muscle lisse, dans les cellules pancréatiques et les lymphocytes. Les cellules épithéliales de l'uretère murin expriment plusieurs canaux TRP, notamment TRPC1 à 5 et TRPV1 à 4 (Yu *et al.*, 2011). Dans les cellules ostéoblastiques humaines MG-63, les différents types de canaux TRPC exprimés sont TRPC1, TRPC3, TRPC4 et TRPC6 et ces cellules expriment aussi les canaux TRPV2 et TRPV4 (Abed *et al.*, 2009). Ces canaux régulent les réponses olfactives, mécaniques et chimiques. Les membres de la famille TRP sont des canaux tétramériques et chaque sous-unité est constituée de six hélices transmembranaires. Ils sont des canaux exprimés au niveau de la membrane plasmique mais possiblement aussi au niveau des organelles intracytoplasmiques comme la mitochondrie (Vriens *et al.*, 2008). Le pore du canal est situé entre les 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> hélices. Ils présentent des domaines ankyrine qui se répètent en des séquences de 33 acides aminés jouant un



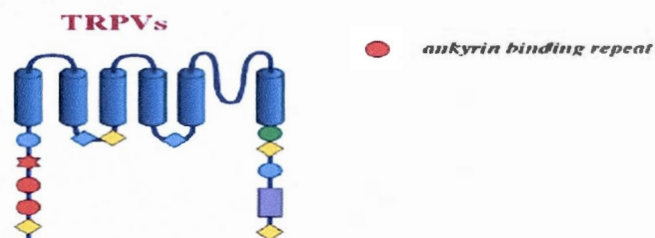
rôle dans la localisation cellulaire et les interactions avec les autres protéines suivant les différents types de canaux (Vriens *et al.*, 2008), et présentent des domaines terminaux NH<sub>2</sub> et COOH intracellulaires. Ces canaux sont tous perméables au calcium sauf les canaux TRPM4 et TRPM5 qui sont perméables aux cations monovalents (Nilius *et al.*, 2007). En se basant sur les homologies structurales et d'acides aminés, les TRP sont classifiés en sept sous-familles, comprenant plusieurs membres: TRPC1 à TRPC7 (Canonique), TRPV1 à TRPV6 (Vallinoïde), TRPM1 à TRPM8 (Mélastatine), TRPP1 et TRPP2 (Polycystine), TRPML1 à TRPML3 (Mucolipine), TRPA1 (Ankyrine) et TRPN (non-mécanosensible, *nompC*) ; les canaux TRPN ne sont pas représentés chez les mammifères (Minke & Cook, 2002).

La sous-famille TRPC (Figure 2.11) est divisée en 3 sous-groupes suivant les alignements des séquences et les comparaisons fonctionnelles : TRPC1/4/5, TRPC3/6/7 et TRPC2. En général, les canaux TRPC sont considérés comme des canaux activés suite à une stimulation des récepteurs qui activent différentes formes de la phospholipase C; ce qui va assurer la vidange des réservoirs calciques intracellulaires (Vazquez *et al.*, 2004; Zhu, 2005). Ils sont non sélectifs mais perméables aux calcium et au sodium. Les canaux TRPC3, TRPC6 et TRPC7 sont activés par le DAG causant un stress au niveau de la membrane et ceci sans la stimulation de la protéine kinase C. Au contraire, les canaux TRPC1, TRPC4 et TRPC6 ne sont pas activés par DAG. Le TRPC1 est directement activé par une déformation mécanique sans l'activité de la phospholipase C (Nilius *et al.*, 2007).



**Figure 2.11. Structure des canaux TRPC.** Les canaux TRPC sont constitués de six hélices transmembranaires ayant les deux extrémités N- et C-terminale à l'intérieur de la cellule et présentant deux domaines d'ankyrine caractéristiques de cette sous-famille. Tirée de (Pedersen *et al.*, 2005)

La sous-famille TRPV (Figure 2.12) est divisée en deux sous-groupes : TRPV1 à TRPV4, qui sont des canaux non sélectifs perméables au calcium et le groupe composé de TRPV5 et TRPV6, qui sont des canaux hautement sélectifs au calcium (Vriens *et al.*, 2008). L'extrémité-N contient 3 à 5 répétitions du domaine ankyrine. Les TRPV1 à TRPV4 sont activés suivant de multiples modes d'activation, comme la chaleur pour les canaux TRPV1 à TRPV4, alors que pour les canaux TRPV2 et TRPV4, c'est l'hypotonicité. Les TRPV1 à TRPV4 sont impliqués dans des fonctions sensorielles telles les mécano-sensations ; ces canaux agissent aussi comme chimiosensitifs pour des ligands endogènes et synthétiques (Nilius *et al.*, 2007). En plus, les canaux TRPV2 peuvent être activés par des facteurs de croissance (O'Neil & Heller, 2005) assurant ainsi un influx calcique à travers la membrane plasmique modulant ainsi la réponse cellulaire. Les canaux TRPV5 et TRPV6 sont régulés par le calcium intracellulaire. Ils jouent un rôle important comme gardien du transport du calcium épithélial.



**Figure 2.12. Structure des canaux TRPV.** Les TRPV sont constitués de six hélices transmembranaires ayant les deux extrémités N- et C-terminale à l'intérieure de la cellule et présentant des domaines d'ankyrine caractéristiques de cette sous-famille. Tirée de (Pedersen *et al.*, 2005).

### 3. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Compte tenu des études qui suggèrent que les LDL oxydés favorisent le développement de l'ostéoporose (Parhami *et al.*, 2001) et que la lysoPC est produite suite à l'oxydation des LDL, deux hypothèses générales sont proposées:

- La lysoPC altère les fonctions ostéoblastiques.
- La lysoPC sollicite le calcium comme mécanismes à l'origine de ses effets néfastes sur les ostéoblastes.

Afin d'évaluer l'effet de la lysoPC sur les fonctions ostéoblastiques dans les cellules MG-63, notre premier objectif était de déterminer les effets de la lysoPC sur la viabilité cellulaire, la migration et la différenciation des cellules pré-ostéoblastiques MC3T3 en des cellules ostéoblastiques matures.

Afin de mettre en évidence l'implication du calcium dans la voie de signalisation induite par la lysoPC, nos objectifs étaient de déterminer le rôle du calcium dans la transduction du signal induit par la lysoPC, sa provenance ainsi que d'identifier les canaux responsables de l'influx de calcium induit par la lysoPC.

## 4. MATÉRIELS

### 4.1 Présentations des modèles cellulaires

Les lignées cellulaires MC3T3 et MG-63 ont été utilisées comme modèles de cellules ostéoblastiques. Les cellules MG-63 représentent une lignée ostéoblastique humaine et elles possèdent une forte capacité à maintenir un phénotype stable dans le temps, gardant ainsi plusieurs caractéristiques pré-ostéoblastiques (Hattar *et al.*, 2002). Les cellules MC3T3 représentent une lignée pré-ostéoblastique murine qui peut se différencier en ostéoblastes matures et former une matrice extracellulaire minéralisée (Sudo *et al.*, 1983).

### 4.2 Produits

Le gadolinium (Gd 100  $\mu$ M, Sigma) a été utilisé comme un bloqueur des canaux TRPC activés suite à une vidange du calcium du réticulum endoplasmique (RE) induit par la thapsigargine (TG 1  $\mu$ M, Sigma), un bloqueur des pompes calciques du RE. Le Ruthénium rouge (RR 5  $\mu$ M, Sigma) a servi de bloqueur de tous les canaux TRPV et le U73122 (U 10  $\mu$ M, Sigma) était utilisé comme inhibiteur de la phospholipase C. Le Tranilast (100  $\mu$ M) a servi d'inhibiteur des canaux TRPV2 (Hisanaga *et al.*, 2009) alors que le RN1734 (30  $\mu$ M) a été utilisé comme inhibiteur des canaux TRPV4 (Vincent *et al.*, 2009). Avant le traitement avec la lysoPC, les cellules ont été pré-incubées pendant 5 à 15 minutes avec les inhibiteurs. Les résultats obtenus en présence d'un bloqueur sont comparés aux résultats obtenus en présence de la lysoPC seule.

## 5. ARTICLE: LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE-INDUCED CYTOTOXICITY IN OSTEOBLASTIC CELLS: INVOLVEMENT OF TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VALLINOIDE CHANNELS

### 5.1 Contribution

Ma contribution dans l'article est le travail qui porte sur l'effet de la lysoPC sur l'apoptose et la nécrose des cellules MG-63, ainsi que les mesures de calcium intracellulaire et l'implication du calcium dans la mort cellulaire induite par la lysoPC. J'ai aussi déterminé l'expression des canaux TRPV dans les cellules MG-63 ainsi que l'implication des canaux TRPV dans l'apoptose de la lysoPC. Elie Abed m'a aidé dans la mise au point de la technique des mesures en microscopie confocale et la réalisation des expériences. Rachel Pierre a réalisé les essais de viabilité pour étudier la cytotoxicité de la lysoPC dans les cellules MG-63 ainsi que l'implication du calcium dans la mort cellulaire induite par la lysoPC. Elle a aussi étudié l'implication de l'activité des canaux TRPV dans la mort cellulaire induite par la lysoPC (Figure 13, 15A, 19).

Cet article est soumis à la revue « journal of cellular biochemistry ».



## 5.2 Résumé

Les études épidémiologiques indiquent que les patients qui souffrent de l'athérosclérose sont prédisposés au développement de l'ostéoporose. En plus, des déterminants athérogéniques comme les lipoprotéines de faible densité (LDL) oxydés provoquent des altérations des fonctions des cellules osseuses. Dans cet article, nous avons étudié la cytotoxicité de la lysophosphatidylcholine (lysoPC), un composant phospholipidique formé lors de l'oxydation des LDL, sur les cellules ostéoblastiques. La lysoPC a réduit la viabilité des cellules ostéoblastiques MG-63 en fonction de sa concentration, avec une  $LC_{50}$  de  $18.7 \pm 0.7 \mu M$ . La lysoPC induit l'apoptose et la nécrose. Comme la dérégulation de l'homéostasie du calcium intracellulaire est souvent associée au mécanisme de la mort cellulaire, nous avons étudié l'implication du calcium dans les voies de signalisation induite par la lysoPC. La lysoPC a induit une augmentation rapide et transitoire du calcium intracellulaire suivi par un influx d'amplitude décroissante mais de longue durée. La mobilisation du calcium intracellulaire dépendait de l'activité de la phospholipase C (PLC) puisque l'inhibition de celle-ci ou la déplétion du calcium du réticulum endoplasmique avec la thapsigargine empêche la mobilisation calcique. L'influx calcique induit par la lysoPC était aboli par l'inhibition des canaux «transient receptor potential vallinoid» (TRPV) avec le ruthénium rouge alors que le gadolinium, qui inhibe les canaux «canonical TRP» (TRPC), n'avait pas d'effet sur l'influx. L'expression des canaux TRPV2 et TRPV4 a été mise en évidence dans les cellules MG-63. En plus, la

cytotoxicité de la lysoPC était réduite en présence du ruthénium rouge, ce qui confirme l'implication de l'activation des canaux TRPV dans la mort cellulaire induite par la lysoPC.

**Lysophosphatidylcholine-induced cytotoxicity in osteoblastic cells: involvement of transient receptor potential vallinoid channels**

Abdallah Fallah, Elie Abed, Rachel Pierre and Robert Moreau\*

Laboratoire du Métabolisme osseux, Centre BioMed, Département des sciences  
Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Running title: Involvement of TRPV channels in lysoPC-induced cytotoxicity



\* Address correspondence to:

Robert Moreau, PhD

Full Professor

Département des sciences biologiques

Université du Québec à Montréal

CP 8888, succ Centre-ville

Montréal (Québec)

Canada H3C 3P8

E-mail: [moreau.robert@uqam.ca](mailto:moreau.robert@uqam.ca)

### 5.3 ABSTRACT

Epidemiological studies indicate that patients suffering from atherosclerosis are predisposed to develop osteoporosis. Accordingly, atherogenic determinants such as oxidized low density lipoprotein (oxLDL) particles have been shown to alter bone cell functions. In this work, we investigated the cytotoxicity of lysophosphatidylcholine (lysoPC), a major phospholipid component generated upon LDL oxidation, on bone-forming MG-63 osteoblast-like cells. Cell viability was reduced by lysoPC in a concentration-dependent manner with a  $LC_{50}$  of  $18.7 \pm 0.7 \mu M$ . LysoPC-induced cell death was attributed to induction of both apoptosis and necrosis. Since impairment of intracellular calcium homeostasis is often involved in the mechanism of cell death, we determined the involvement of calcium in lysoPC-induced cytotoxicity. LysoPC promoted a rapid and transient increase in intracellular calcium attributed to mobilization from calcium stores, followed by an influx. Intracellular calcium mobilization was associated with phospholipase C-dependent mobilization of calcium from the endoplasmic reticulum since inhibition of PLC or depletion of reticulum endoplasmic calcium with thapsigargin prevented the calcium mobilization. The calcium influx induced by lysoPC was abolished by inhibition of transient receptor potential vullinoid (TRPV) channels with ruthenium red whereas gadolinium, which inhibits canonical TRP (TRPC) channels, was without effect. Accordingly, expression of TRPV2 and TRPV4 was shown in MG-63 cells. Addition

of TRPV inhibitor ruthenium red in the incubation medium reduced lysoPC-induced cytotoxicity, which confirms the involvement of TRPV activation in lysoPC-induced cell death.

#### 5.4 INTRODUCTION

Epidemiologic studies have reported a correlation between atherosclerosis and the development of osteoporosis (Barengolts and al., 1998; Uyama and al., 1997). Indeed, it was shown that patients with lower bone density and osteoporosis present higher lipid levels (Barengolts and al., 1998; Uyama and al., 1997). It is well established that cardiovascular diseases are directly related to plasma concentrations of LDL cholesterol (Castelli and al., 1977), which suggests that both pathologies may share one or several contributory factors. Accordingly, atherosclerosis-susceptible C57BL/6 mice maintained on an atherogenic high-fat diet show reduced bone formation and low bone mass (Parhami and al., 2001).

Osteoporosis results from the loss of equilibrium between bone cell functions, such as increased osteoclast-mediated bone resorption over bone formation by osteoblasts, leading to reduced bone mass, lower mineral density, and thereby higher bone fragility and susceptibility to fractures. Although the importance of cholesterol in the development of osteoporosis has been highlighted, it remains largely unknown how lipids can affect bone metabolism. Given that it is well established that LDL particles become pro-atherogenic after undergoing oxidative modifications (Steinberg and al., 1997), oxidized LDL (OxLDL) would also be expected to be responsible for osteoporosis. Indeed, studies have indicated that OxLDL has deleterious effects on the differentiation of cells towards an osteoblastic phenotype (Parhami and al.,

1997;Mody and al., 2001). OxLDL and oxidative products inhibit osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and preosteoblasts in favour of an adipogenic phenotype. Also, studies showed that OxLDL caused cell death of human osteoblasts (Klein and al., 2003;Klein and al., 2006). The possible implication of OxLDL in the development of osteoporosis was further highlighted by our previous studies which demonstrated that osteoblastic cells express receptors for OxLDL (Brodeur and al., 2008) and that OxLDL particles promote cell death of osteoblasts (Hamel and al., 2008;Brodeur and al., 2008).

Upon oxidative modifications of LDL, oxysterols are generated such as 7-ketocholesterol and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol, which are found in atherosclerotic lesions (Brown and al, 1999). Moreover, phosphatidylcholine is converted to lysophosphatidylcholine (lysoPC) by phospholipase A2 activity present in LDL (Parthasarathy and al., 2010). Thereby, lysoPC is a major phospholipid component of OxLDL and is implicated as a critical factor in the atherogenic activity of OxLDL (Schmitz and al, 2010). LysoPC has been associated with atherosclerosis, as well as acute and chronic inflammation by altering various functions in a number of cell types including endothelial cells, smooth muscle cells, monocytes, macrophages, and T-cells (Fuchs and al, 2009). LysoPC triggers apoptosis of vascular smooth muscle cells (Hsieh and al., 2000;Hsu and al., 2011) and endothelial cells (Takahashi and al., 2002;Matsubara and al, 2005;Zhou and al., 2006). Of interest, intracellular calcium signaling was associated to lysoPC-induced apoptosis of smooth muscle and

endothelial cells (Song and al., 2010;Hsu and al, 2011;Zhou and al, 2006). Numerous studies have associated impairment of intracellular calcium homeostasis to apoptosis. Activation of transient receptor potential channels (TRP) was associated with oxidative stress-induced cell death (Miller and al, 2006) and to oxLDL-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells (Ingueneau and al., 2009).

The TRP channels contain six putative transmembrane domains, which are thought to assemble as homo- or hetero-tetramers to form channels (for a review (Pedersen and al., 2005)). All TRPs are cation channels, although the permeability for different mono- and divalent cations varies greatly between isoforms. They are activated by a wide range of stimuli including intra- and extracellular messengers, chemical, mechanical, and osmotic stress, and some by the filling state of intracellular calcium stores. Based on amino acid homologies, the mammalian TRP channel superfamily has been divided into seven families: TRPC, TRPM, TRPV, TRPML, TRPP, TRPA and TRPN. The TRPC ('Canonical') and TRPM ('Melastatin') subfamilies consist of seven and eight different channels, respectively (i.e., TRPC1–TRPC7 and TRPM1–TRPM8). The TRPV ('Vallinoid') subfamily presently comprises six members (TRPV1–TRPV6). The TRPML ('Mucolipin') family comprises three members, and the TRPP ('Polycystin') family three channel-like and five non-channel members, respectively. The most recently proposed subfamily, TRPA ('Ankyrin'), has only one mammalian member, TRPA1, and finally, the TRPN (no mechanoreceptor potential C, or NOMPC) has so far only been detected in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*,



and zebra fish. There has been increasing interest in the first three families because of their involvement in several human diseases while the last four families are insufficiently characterized. We have reported that MG-63 osteoblast-like cells express numerous TRP channels (Labelle and al., 2007;Abed and al, 2007;Abed and al., 2009).

In the current study, we investigated the cytotoxicity of lysoPC as a major phospholipid component generated upon LDL oxidation, in MG-63 osteoblast-like cells and determined the involvement of calcium in lysoPC-induced cytotoxicity.

## 5.5 MATERIALS AND METHODS

### 5.5.1 Cell culture

Human osteoblast-like MG-63 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) and were grown in a 1:1 mixture of phenol-free DMEM/Ham's F12 medium (DMEM/F12; Sigma, Oakville, Ontario, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cansera, Etobicoke, Ontario, Canada), L-glutamine (2mM, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) and penicillin/streptomycin (100 µg/ml, Invitrogen). Cells were cultured in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and were harvested weekly with Trypsin-EDTA solution (Invitrogen).

### 5.5.2 Cell viability assays

For cell viability experiments, cells were seeded in 96-well plates (Sarstedt, Montréal, Québec, Canada). After 5 days of culture in supplemented media, cells were incubated in culture medium without serum in the absence or the presence of increasing concentrations of lysoPC (Sigma) without or with ruthenium red (Sigma) for 48 h. For experiments with low levels of calcium in medium, cells were incubated in DME/F12 (culture medium without calcium and magnesium, Sigma) supplemented with 0.25 mM calcium and 0.8 mM magnesium. Cell viability was determined by microtiter tetrazolium (MTT) reduction assays. Briefly, one hour before the end of treatment the medium was replaced with DMEM/F12 containing 0.5 mg/ml of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrasodium bromide (MTT) (Sigma). At the end of the incubation, media was aspirated and formazan crystals generated by the cellular reduction activity were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). Absorbance was

measured at 575 nm and data are expressed as the ratio of absorbance of treated cells versus control cells. In parallel experiments, cells exposed to lysoPC were dyed with crystal violet, then solubilised in 1 % SDS and quantified with a spectrophotometer (575 nm), or harvested by trypsinisation to perform a cell count.

#### 5.5.3 Cell death assays

MG-63 cells seeded in 12-well plates were incubated with lysoPC or in culture medium. After 24 h, floating cells were discarded and adherent cells were collected by trypsinization and centrifugation at 250g for 5 min. Cells were washed with PBS and then incubated with 2 µg of propidium iodide (PI) and 10 µl of FITC-annexin V per milliliter (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for 15 min at 4°C. At the end of the incubation, 400 µl of cold PBS, a phosphate buffer, was added and cellular FITC-annexin V and PI fluorescences were detected by using a fluorescence-activated cell sorter (FACScan, Becton Dickinson, Mississauga, Canada) and data were analyzed with Cell Quest software (Becton Dickinson). Cells negative for PI uptake and positive for FITC-annexin V were considered apoptotic.

#### 5.5.4 Reverse-transcription polymerase chain reaction

Total RNA from cells was extracted using TriZol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription (RT) reactions were carried out with Omniscript RT kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) using hexamers. The PCR amplifications were conducted with *Taq* PCR core kit (Qiagen) using specific primer sets for human TRPV1-6 (Abed and al, 2009). Each primer was designed in

distinct exons to ensure specific transcript amplifications. Briefly, amplifications were carried out for 40 cycles according to incubation of 1 min at 94°C, 30 sec at 58°C and 1 min at 72°C. Amplification products were resolved in 2% agarose gel with ethidium bromide revelation.

#### 5.5.5 Measurements of intracellular calcium

MG-63 cells were cultured in 8-well Labtek plate (Nalge Nunc) for 5 days in supplemented media. Cells were then transferred to HEPES-buffered saline solution (HBSS (mM): 121 NaCl, 5.4 KCl, 25 HEPES, 1.8 CaCl<sub>2</sub> and 6.0 NaHCO<sub>3</sub> at pH 7.3) and loaded with 2µM Fluo-3 AM with an equivalent volume of 20% Pluronic F127 (Invitrogen) for 45 min at room temperature in the dark. Thereafter cells were washed with corresponding HBSS and the loaded dye was allowed to deesterify for 45 min at room temperature in the dark. Following transfer to a calcium-free HBSS, treatments were made in an open chamber configuration at room temperature. The cells were examined with a laser scanning confocal (Bio-Rad) microscope (Nikon TE300) with an Apochromatic 40X N.A. 1.0 objective lens. Fluorescence was excited by an argon laser at 488nm and emission was collected with a 515nm filter. Data were analyzed with Laser Sharp 2.1T, Time Course 1.0 software for 7 to 8 fields per experiment (between 10 and 20 cells per field). All experiments were performed for at least four individual experiments.

#### 5.5.6 Immunolocalization

MG-63 cells were cultured in 8-wells Labtek (Nalge Nunc, Napperville, IL, USA) dishes for 5 days in supplemented medium. Cells were fixed in 4% formaldehyde/phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min at 4 °C, permeabilized with 0.05% Tween/PBS for 15 min and blocked in 2% bovine serum albumin/PBS for 30 min. Cells were incubated overnight with primary antibodies (1:500 for anti-TRPV2 and anti-TRPV4 from Alomone, Jerusalem, Israel) or primary antibodies preincubated with 1 µg antigen followed by an incubation with secondary antibodies (1:2000 for anti rabbit IgG coupled to rhodamine from Chemicon, Temecula, CA) for 1 hour. Cells were washed three times with PBS between each step. The cells were examined with a laser scanning confocal (Bio-Rad) microscope (Nikon TE300) with an Apochromatic 40X N.A. 1.0 objective lens. Fluorescence was excited by an argon laser at 555nm and emission was collected with a 565 filter.

#### 5.5.7 Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, and the significance of differences between groups has been determined using GrafPadPrism 5.0 Software by analysis of variance. Differences between groups were further evaluated by Student T test or two-way ANOVA with Bonferroni or Dunnett post tests. Differences were considered significant at  $P \leq 0.05$ .



## 5.6 RESULTS

### 5.6.1 Effect of LysoPC on the viability of MG-63

Our previous studies showed that oxidized LDL cause osteoblastic cell death (Hamel and al, 2008; Brodeur and al, 2008). Since lysoPC is a major phospholipid component generated upon LDL oxidation (Parthasarathy and al, 2010), we determined its effect on the viability of osteoblastic MG-63 cells. We performed MTT assays on cells incubated for 48 hours with increasing concentrations of lysoPC. As shown in Fig. 5.1 A, exposure of MG-63 cells to lysoPC resulted in a reduction of the MTT activity in a concentration-dependent manner. Curve analysis with the Boltzmann sigmoidal equation gave a  $LC_{50}$  (concentration that cause 50% reduction of MTT activity) of  $18.7 \pm 0.7 \mu\text{M}$  with a significant reduction starting from  $15 \mu\text{M}$  (Dunnett test,  $P < 0.05$ ). To ascertain that this reduction of MTT activity corresponded to cell mortality, similar experiments were performed and cells were either stained with crystal violet or counted after trypsinization. In accordance with data from MTT assays, similar dose-dependent reductions of crystal violet staining and cell counts were obtained (Fig. 5.1 B) for cells treated with increasing concentrations of lysoPC with  $LC_{50}$  values of  $17.6 \pm 1.4$  and  $16.5 \pm 0.9 \mu\text{M}$  respectively. These different experiments confirmed that lysoPC reduces MG-63 cell viability in a dose-dependent manner.

To further document lysoPC-induced cell death, we determined the levels of apoptosis and necrosis by staining cells with FITC-annexin V and propidium iodide

(PI). As shown in Fig. 5.2 A, analysis of adherent cells showed that incubation with lysoPC resulted in the appearance of cell populations that were positive for FITC-annexin V and/or positive for PI staining. Apoptosis and necrosis were enhanced with increasing concentrations of lysoPC (Fig. 5.2 B) which indicates that lysoPC promotes cellular apoptosis and necrosis. Mean values for combined early and late apoptosis were 16% and 28% for lysoPC, 15 and 30  $\mu$ M, respectively, and 12% and 22% for necrosis at 15 and 30  $\mu$ M lysoPC, respectively.

#### 5.6.2 LysoPC triggers intracellular calcium mobilization and influx

Since impairment of intracellular calcium homeostasis is often seen as a mechanism triggering cell death, we determined the involvement of extracellular calcium in lysoPC-induced cell death. As shown in Fig. 5.3 A, decreasing the level of calcium in the culture medium reduced the cell death induced by lysoPC. Therefore, we undertook to measure intracellular calcium levels upon treatment with lysoPC. Measurements of intracellular calcium levels were performed in MG-63 cells loaded with the fluorescent calcium probe Fluo-3. As shown in Fig. 5.3 B, lysoPC promoted a transient increase in intracellular calcium levels in cells incubated in calcium-free buffer, which indicates a mobilization of calcium from intracellular pools. After fluorescence had returned to basal levels, a sustained calcium influx was noticed upon addition of calcium in the incubation buffer. It should be noted that no calcium influx was obtained after the addition of calcium alone without treatment with lysoPC (data not shown). Thereafter, two strategies were used to further identify the origin of the

intracellular calcium mobilization and determine the signaling pathway involved. First, cells were treated with 1  $\mu$ M of Thapsigargin (Tg) to deplete the calcium from the endoplasmic reticulum. As shown in Fig. 5.4 A, calcium mobilization by lysoPC was abolished after two subsequent additions of Tg whereas the calcium influx was still observed. On the other hand, cells were pretreated with an inhibitor of phospholipase C (PLC), namely U73122, to determine the signaling pathway triggered by lysoPC. As shown in Fig. 5.4 B, calcium mobilization by lysoPC was abolished in cells pretreated with U73122 whereas calcium influx was still observed. These results indicated that lysoPC induces the mobilization of calcium from the endoplasmic reticulum upon activation of phospholipase C.

No calcium mobilization or influx was seen with the atherogenic lipid 7-ketocholesterol (data not shown), which has also been shown to promote cell death in MG-63 cells (Hamel and al, 2008).

### 5.6.3 Activation of TRP channels by lysoPC

To identify which subclass family of TRP channels was associated with the lysoPC-induced calcium influx, we first characterized two TRP channel inhibitors, namely gadolinium ( $Gd^{3+}$ ) and ruthenium red (RR). As shown in Fig. 5.5 A,  $Gd^{3+}$  efficiently inhibited calcium influx induced following Tg-mediated calcium mobilization from the endoplasmic reticulum. Under these conditions, we previously showed that Tg-induced calcium mobilization from the endoplasmic reticulum triggers the activation of TRPC channels (Labelle and al, 2007; Abed and al, 2009). Therefore,  $Gd^{3+}$  was

used as an inhibitor of TRPC channels under our experimental conditions. As shown in Fig. 5.5 B, RR was without effect on the calcium influx associated with Tg-induced calcium mobilization, which argues that RR acts as a known TRPV channel inhibitor. Since our results indicated that, similarly to Tg, lysoPC also induced a calcium mobilization from the endoplasmic reticulum, we asked if the lysoPC-induced calcium influx involved the activation of TRPC channels. As shown in Fig. 5.5 C, pretreatment of cells with  $Gd^{3+}$  did not prevent the calcium influx induced by lysoPC. On the other hand, the lysoPC-induced calcium influx was prevented by pretreating cells with the inhibitor of the TRPV channels RR (Fig. 5.5 D).

#### 5.6.4 Gene expression of TRPV channels by MG-63 cells.

We previously reported that numerous osteoblast cell lines express TRPV channels by studying their genomic expression (Abed and al, 2009). However, the presence of corresponding proteins is still to be confirmed by western blott. Therefore, we investigated genomic expression of TRPV in MG-63 cells. As shown in Fig. 5.6 A, PCR products were obtained for TRPV2 and TRPV4 with RNA from MG-63 cells. No PCR products were observed for other members of the TRPV family such as TRPV1, TRPV3, TRPV5 and TRPV6 (data not shown). By immunofluorescence, we confirmed the presence of TRPV2 and TRPV4 proteins mainly at the plasma membrane of cells (Fig. 5.6 B).

#### 5.6.5 Activation of TRPV channels by lysoPC is associated with cell death

Since our results indicated that lysoPC promotes the activation of TRPV channels, we investigated the relationship between TRPV activation and cell death induced by lysoPC. As shown in Fig. 5.7 A, the decrease of MTT activity induced by lysoPC was reduced in the presence of the TRPV channel inhibitor RR and curve analysis give  $LC_{50}$  values of  $18.6 \pm 0.8$  vs  $30.33 \pm 3.5$   $\mu$ M. In contrast, cell death induced by the atherogenic lipid 7-ketocholesterol, another product of LDL oxidation, was not prevented by RR (Figure 5.7 B). Accordingly with the results of 5.7 A, RR was shown to reduce lysoPC-induced cell apoptosis but had no effect on necrosis (Figure 5.8).



## 5.7 DISCUSSION

Epidemiologic and *in vitro* studies argue for the involvement of atherogenic conditions and oxLDL in the development of osteoporosis (Barengolts and al, 1998; Uyama and al, 1997; Parhami and al, 1997; Mody, Parhami and al, 2001; Klein and al, 2003; Klein and al, 2006; Hamel and al, 2008; Brodeur and al, 2008). Since lysoPC is a major phospholipid component of oxLDL, we investigated its effect on the viability of osteoblastic cells. Our results indicate that lysoPC induced cell death of MG-63 cells, an effect that was dependent on extracellular calcium and was reduced by RR, a known inhibitor of TRPV channels. Accordingly, we reported that lysoPC promoted phospholipase C-dependent mobilization of calcium from the endoplasmic reticulum as well the activation of TRPV channels. Moreover, we report that lysoPC promoted both apoptosis and necrosis in MG-63 osteoblast cells, and that lysoPC-triggered apoptosis was reduced by RR. Our results suggest that lysoPC promotes apoptosis in MG-63 cells by the activation of TRPV channels.

Oxysterols such as 7-ketocholesterol and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol, as well as lysoPC are found in atherosclerotic lesions (Brown and al, 1999). These components are generated upon oxidation and enzymatic modification of LDL (Parthasarathy and al, 2010) and are implicated as critical factors in the atherogenic activity of oxLDL (Schmitz and al, 2010) and probably for the development of osteoporosis. Our results indicate that lysoPC induced cell death of osteoblast-like MG-63 cells. Cytotoxicity

was monitored by the reduction of MTT activity, crystal violet staining and cell counts, and experiments revealed  $LC_{50}$  values between 16.5 and 18.7  $\mu$ M. Hsu et al. have reported  $LC_{50}$  values between 5-10  $\mu$ M for cytotoxicity of lysoPC in primary cultures of vascular smooth muscle cells (Hsu and al, 2011). An Other study has reported around 37 $\mu$ M for the same cell type (Hsieh and al, 2000). Values of  $LC_{50}$  for lysoPC were between 50-100  $\mu$ M in endothelial cells (Matsubara and al, 2005;Takahashi and al, 2002). Further investigations on the mode of cell death as a function of concentration revealed that lysoPC promoted both apoptosis and necrosis of MG-63 cells. Hsieh et al (Hsieh and al, 2000) also reported induction of apoptosis and necrosis by lysoPC in vascular smooth muscle cells. (Zhou et al, 2006) reported apoptosis and necrosis in endothelial cells. LysoPC is an amphipathic molecule and in accordance, possesses “detergent-like” properties which have been studied extensively in relation to lysis of red blood cells (Weltzien and al, 1979). Therefore, induction of necrosis by lysoPC may likely be attributed to such membrane-perturbing properties.

Since dysfunctional regulation of intracellular calcium homeostasis is often associated with cell death, we determined the involvement of extracellular calcium in the lysoPC-induced cell death. LysoPC-induced cytotoxicity was reduced when cells were incubated in low calcium medium. Cytotoxicity induced by the atherogenic oxysterol 7-ketocholesterol was not modified by the calcium content of incubation medium (data not shown). Therefore, a specific mechanism involving extracellular

calcium is triggered upon induction of cell death by lysoPC. Accordingly, our results indicated that lysoPC induces PLC-mediated calcium mobilization from the endoplasmic reticulum and calcium influx. Two G protein-coupled receptors for lysoPC have been proposed, namely GPR4 and G2A (Meyer zu and al, 2007). G2A shows high binding affinity for lysoPC and was shown to be coupled to Gq protein. Also, G2A was shown to promote apoptosis in the presence of lysoPC (Lin and Ye, 2003). Therefore, our data showing PLC-mediated calcium mobilization by lysoPC would be in accordance with the involvement of G2A as the lysoPC receptor in MG-63 cells. To our knowledge, no study has yet investigated the expression of G2A in osteoblasts.

In addition to promoting calcium mobilization from the endoplasmic reticulum, our results indicate that lysoPC stimulated a calcium influx. We previously showed gene expression of numerous TRP channels by MG-63 cells (Abed and al, 2009). Moreover, we have shown that Tg- and mitogen-induced calcium mobilization from the endoplasmic reticulum triggered the activation of TRPC channels in MG-63 cells (Labelle and al, 2007;Abed and al, 2009). Since, lysoPC triggers calcium mobilization from the endoplasmic reticulum, subsequent activation of TRPC channels was plausible. Nevertheless, lysoPC-induced calcium influx was not prevented by gadolinium, although our results demonstrate that this inhibitor efficiently blocked Tg-induced calcium influx in MG-63 cells, suggesting that lysoPC activates other members of the TRP channel family. We used RR as a known

inhibitor of TRPV channels. Our results showed that lysoPC-induced calcium influx was fully inhibited by RR. LysoPC was shown to activate TRPC6 channels in corporal smooth muscle cells (So and al., 2005), suggesting a mechanism linking atherogenic condition to erectile dysfunction. LysoPC was shown to activate TRPC5 channels which confer to this type of channel the property of a lipid ionotropic receptor (Flemming and al., 2006). LysoPC was shown to activate TRPC5 and TRPC6 which results in the inhibition of the migration of endothelial cells (Chaudhuri and al., 2008). LysoPC was shown to activate TRPV2 channels and stimulate prostate cancer cell migration (Monet and al., 2009). Therefore, our results provide further evidence that lysoPC activates TRPV channels in osteoblasts. Accordingly, TRPV2 and TRPV4 channels were localized to the plasma membrane of MG-63 cells, where they can assure calcium influx upon activation by lysoPC.

In agreement with the reduced lysoPC-induced cell death observed in low calcium medium, our results indicate that inhibition of TRPV channels by RR decreased the cytotoxicity of lysoPC. Moreover, inhibition of TRPV channels by RR reduced lysoPC-induced apoptosis of MG-63 cells whereas being without having an effect on necrosis. Our data agree with previous studies which indicate that intracellular calcium signaling was associated to lysoPC-induced apoptosis of smooth muscle and endothelial cells (Song and al, 2011; Zhou and al, 2006). In contrast to apoptosis, which is a tightly regulated process involving activation and enzymatic steps with maintenance of plasma membrane integrity, necrosis is associated with plasma

membrane disruption and impairment of homeostasis. Therefore, the absence of effect of RR on lysoPC-induced necrosis agrees with necrosis being a disorganized process.

Altogether, our results are in accordance with the role of lysoPC as an atherogenic factor contributing to the development of osteoporosis.

#### 5.8 Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.



## 5.9 REFERENCES

- Abed E, Labelle D, Martineau C, Loghin A, Moreau R (2009) Expression of transient receptor potential (TRP) channels in human and murine osteoblast-like cells. *Mol.Membr.Biol.* 26:146-158
- Abed E, Moreau R (2007) Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation. *Cell Prolif.* 40:849-865
- Barengolts EI, Berman M, Kukreja SC, Kouznetsova T, Lin C, Chomka EV (1998) Osteoporosis and coronary atherosclerosis in asymptomatic postmenopausal women. *Calcif.Tissue Int.* 62:209-213
- Brodeur MR, Brissette L, Falstraalt L, Luangrath V, Moreau R (2008a) Scavenger Receptor of Class B Expressed by Osteoblastic Cells Are Implicated in the Uptake of Cholesteryl Ester and Estradiol from LDL and HDL(3). *J Bone Miner.Res.*
- Brodeur MR, Brissette L, Falstraalt L, Ouellet P, Moreau R (2008b) Influence of oxidized low-density lipoproteins (LDL) on the viability of osteoblastic cells. *Free Radic.Biol.Med.* 44:506-517
- Brown AJ, Jessup W (1999) Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 142:1-28
- Castelli WP et al. (1977) HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease. The cooperative lipoprotein phenotyping study. *Circulation* 55:767-772
- Chaudhuri P, Colles SM, Bhat M, Van Wagoner DR, Birnbaumer L, Graham LM (2008) Elucidation of a TRPC6-TRPC5 channel cascade that restricts endothelial cell movement. *Mol.Biol.Cell* 19:3203-3211
- Flemming PK et al. (2006) Sensing of lysophospholipids by TRPC5 calcium channel. *J.Biol.Chem.* 281:4977-4982
- Fuchs B, Schiller J (2009) Lysophospholipids: their generation, physiological role and detection. Are they important disease markers? *Mini.Rev.Med.Chem.* 9:368-378

Hamel P, Abed E, Brissette L, Moreau R (2008) Characterization of oxidized low density lipoproteins-induced hormesis-like effects in osteoblastic cells. *Am.J Physiol Cell Physiol* in press

Hsieh CC, Yen MH, Liu HW, Lau YT (2000) Lysophosphatidylcholine induces apoptotic and non-apoptotic death in vascular smooth muscle cells: in comparison with oxidized LDL. *Atherosclerosis* 151:481-491

Hsu JH et al. (2011) Labeledipinedilol-A prevents lysophosphatidylcholine-induced vascular smooth muscle cell death through reducing reactive oxygen species production and anti-apoptosis. *Atherosclerosis* 217:379-386

Ingueneau C et al. (2009) TRPC1 is regulated by caveolin-1 and is involved in oxidized LDL-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *J.Cell Mol.Med.* 13:1620-1631

Klein BY, Kerem Z, Rojansky N (2006) LDL induces Saos2 osteoblasts death via Akt pathways responsive to a neutral sphingomyelinase inhibitor. *J Cell Biochem* 98:661-671

Klein BY, Rojansky N, Ben Yehuda A, Abou-Atta I, Abedat S, Friedman G (2003) Cell death in cultured human Saos2 osteoblasts exposed to low-density lipoprotein. *J.Cell Biochem.* 90:42-58

Labelle D, Jumarie C, Moreau R (2007) Capacitative calcium entry and proliferation of human osteoblast-like MG-63 cells. *Cell Prolif.* 40:866-884

Lin P, Ye RD (2003) The lysophospholipid receptor G2A activates a specific combination of G proteins and promotes apoptosis. *J.Biol.Chem.* 278:14379-14386

Matsubara M, Hasegawa K (2005) Benidipine, a dihydropyridine-calcium channel blocker, prevents lysophosphatidylcholine-induced injury and reactive oxygen species production in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 178:57-66

Meyer zu HD, Jakobs KH (2007) Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochim.Biophys.Acta* 1768:923-940

Miller BA (2006) The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *J.Membr.Biol.* 209:31-41

Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL (2001) Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic.Biol.Med.* 31:509-519

Monet M et al. (2009) Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. *Biochim.Biophys.Acta* 1793:528-539

Parhami F et al. (1997) Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17:680-687

Parhami F, Tintut Y, Beamer WG, Gharavi N, Goodman W, Demer LL (2001) Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. *J.Bone Miner.Res.* 16:182-188

Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N (2010) Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol.Biol.* 610:403-417

Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (2005) TRP channels: an overview. *Cell Calcium* 38:233-252

Schmitz G, Ruebsaamen K (2010) Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 208:10-18

So I, Chae MR, Kim SJ, Lee SW (2005) Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces the change of calcium mobilization via TRPC ion channels in cultured human corporal smooth muscle cells. *Int.J.Impot.Res.* 17:475-483

Song J, Liu K, Yi J, Zhu D, Liu G, Liu B (2010) Luteolin inhibits lysophosphatidylcholine-induced apoptosis in endothelial cells by a calcium/mitochondrion/caspases-dependent pathway. *Planta Med.* 76:433-438

Steinberg D (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J.Biol.Chem.* 272:20963-20966

Takahashi M, Okazaki H, Ogata Y, Takeuchi K, Ikeda U, Shimada K (2002) Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in human endothelial cells through a p38-mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Atherosclerosis* 161:387-394

Uyama O, Yoshimoto Y, Yamamoto Y, Kawai A (1997) Bone changes and carotid atherosclerosis in postmenopausal women. *Stroke* 28:1730-1732

Weltzien HU (1979) Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochim.Biophys.Acta* 559:259-287

Zhou L, Shi M, Guo Z, Brisbon W, Hoover R, Yang H (2006) Different cytotoxic injuries induced by lysophosphatidylcholine and 7-ketocholesterol in mouse endothelial cells. *Endothelium* 13:213-226

Figure 5.1. Fallah et al.

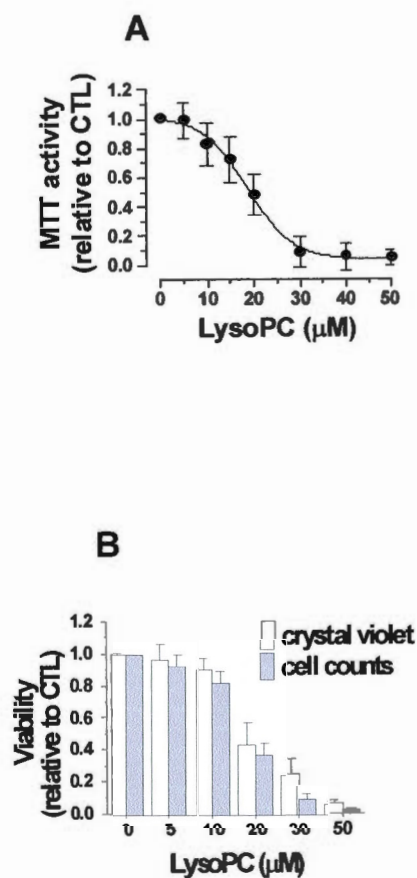


Fig. 5.1 Cytotoxicity of lysoPC in MG-63 cells. (A) Dose-response curve of MTT activity (relative to control without lysoPC) following a 48-h exposure to increasing concentrations of lysoPC in serum-free culture medium. Values are mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments performed in triplicates. (B) Dose-response analysis of cell viability (relative to control without lysoPC) following a 48-h exposure to increasing concentrations of lysoPC in serum-free culture medium, as measured through crystal violet staining and cell counts. Values are mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments in triplicates.



Figure 5.2. Fallah et al.

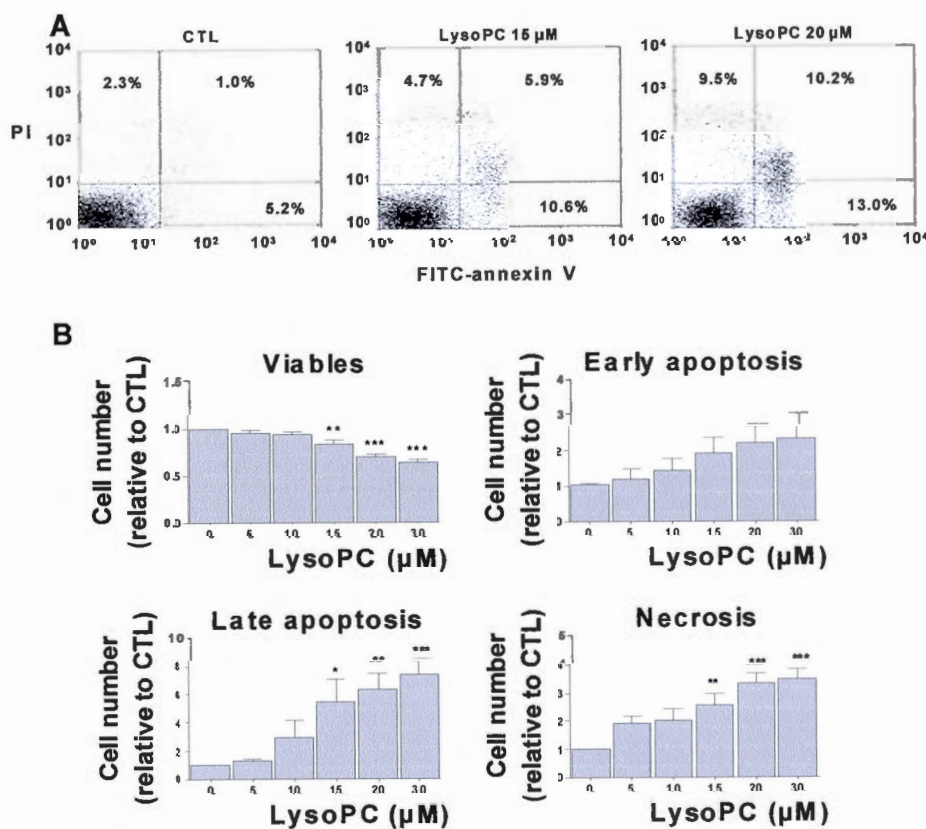


Fig. 5.2 LysoPC promotes cell death by apoptosis and necrosis. MG-63 cells seeded in 12-well plates were incubated in serum-free culture medium without lysoPC (CTL) or in the presence of increasing concentrations of lysoPC for 24 h. A) Cells were then labeled with FITC-annexin-V and propidium iodide and fluorescence was analyzed by flow cytometry. B) Percentage of cells relative to the control without lysoPC are shown as a function of increasing concentrations of lysoPC for viable cells (lower left quadrant), early apoptosis (lower right quadrant), late apoptosis (upper right quadrant) and necrosis (upper left quadrant). Values are mean  $\pm$  SEM of 7 independent experiments compared to control without lysoPC using a Dunnett test : \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

Figure 5.3. Fallah et al.

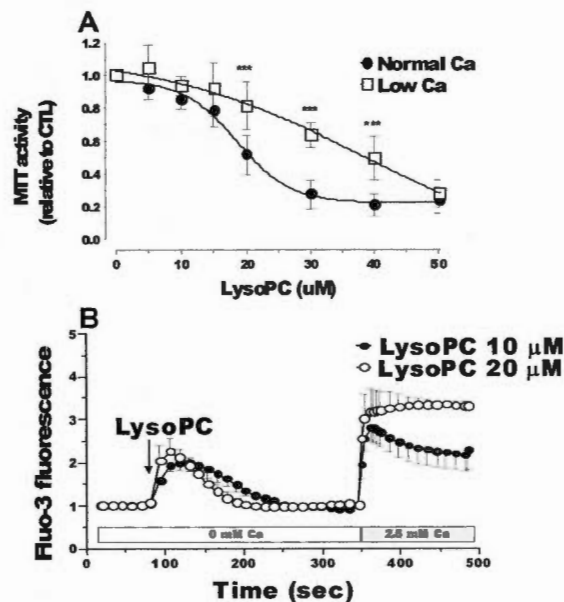


Fig. 5.3 Importance of extracellular calcium in the lysoPC-induced cell death. (A) Dose-response curve of MTT activity (relative to control without lysoPC) following a 48-h exposure to increasing concentrations of lysoPC in serum-free medium with low 0.25 mM calcium concentration or normal 1 mM calcium concentration. Values are mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments in triplicates. Bonferroni post test: \*\*\* $p < 0.001$  when compared to condition with normal 1 mM calcium. B) Fluo3 loaded cells were transferred to HBSS without calcium and then lysoPC (10 or 20  $\mu\text{M}$ ) was added to the incubation medium. Measurements of intracellular calcium were performed with a laser scanning confocal as described in the Material and Methods section. Thereafter, calcium was added to the incubation buffer to determine calcium influx. Fluo-3 fluorescence values relative to basal fluorescence are shown as mean  $\pm$  SEM of 3-5 experiments with analyses of 7 to 8 fields per experiment (between 10 and 20 cells per field).

Figure 5.4. Fallah et al.

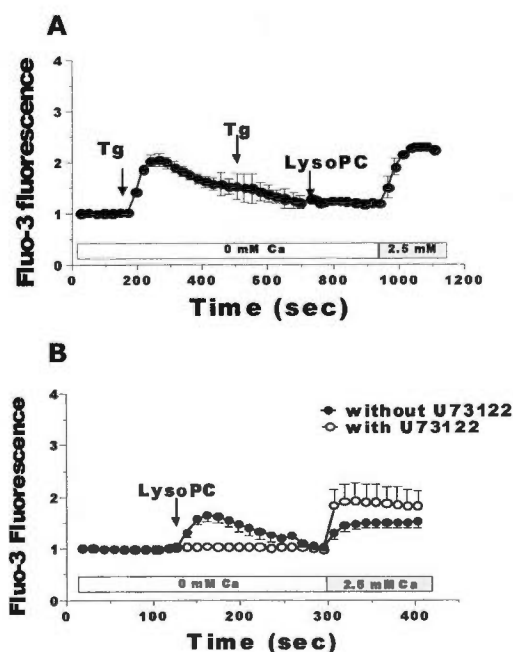


Fig. 5.4 Characterization of calcium mobilization induced by lysoPC. A) Cells loaded with Fluo3 were transferred to HBSS without calcium and then calcium depletion of the endolasmic reticulum was achieved by two subsequent additions of thapsigargin (Tg 5  $\mu$ M). Thereafter, lysoPC (10  $\mu$ M) was added to the incubation medium. Measurements of intracellular calcium were performed with a laser scanning confocal as described in the Material and Methods section. Thereafter, calcium was added to the incubation buffer to determine calcium influx. B) Cells loaded with Fluo3 were transferred to HBSS without calcium and preincubated with 10  $\mu$ M U73122 for 5 min. Thereafter, lysoPC (10  $\mu$ M) was added to the incubation medium. Measurements of intracellular calcium were performed with a laser scanning confocal as described in the Material and Methods section. Thereafter, calcium was added to the incubation buffer to determine calcium influx. Values are mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments with analyses of 7 to 8 fields per experiment (between 10 and 20 cells per field).

Figure 5.5. Fallah et al.

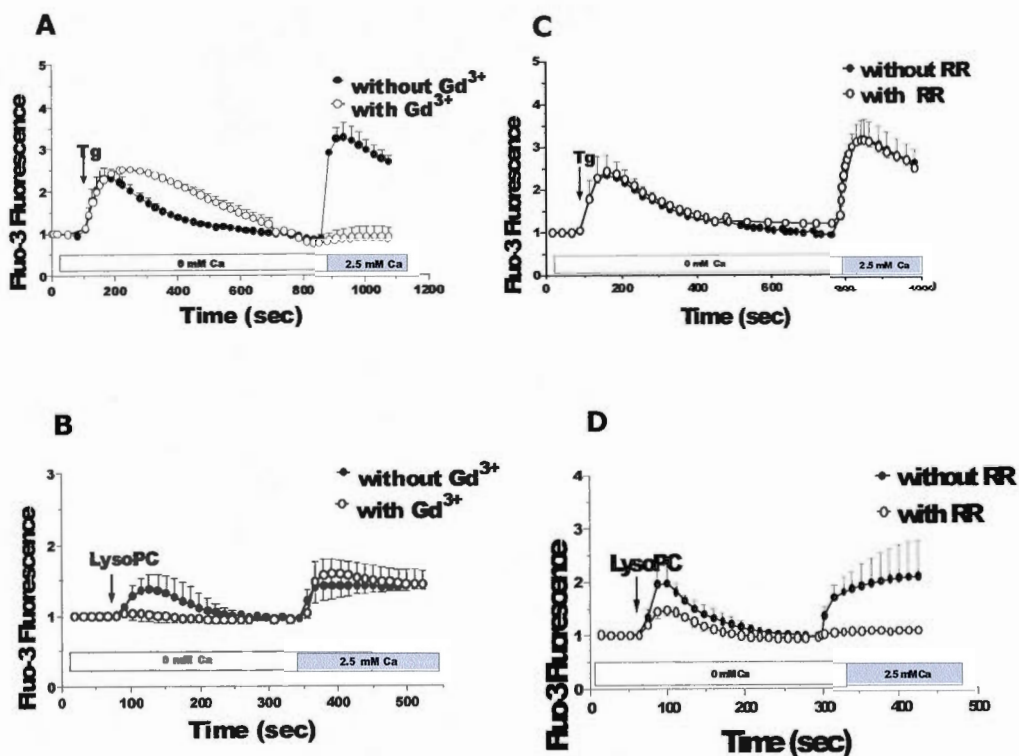


Fig. 5.5 Characterization of calcium influx induced by lysoPC. Cells loaded with Fluo3 were transferred to HBSS without calcium and preincubated with 100  $\mu$ M  $Gd^{3+}$  (A, C) or 10  $\mu$ M RR (B, D) for 5 min. Thereafter, 10  $\mu$ M Tg (A, B) or 10  $\mu$ M lysoPC (C, D) was added to the incubation medium. Measurements of intracellular calcium were performed with a laser scanning confocal as described in the Material and Methods section. Thereafter, calcium was added to the incubation buffer to determine calcium influx. Values are mean  $\pm$  SEM of 3 individual experiments with analyses of 7 to 8 fields per experiment (between 10 and 20 cells per field).

Figure 5.6. Fallah et al.

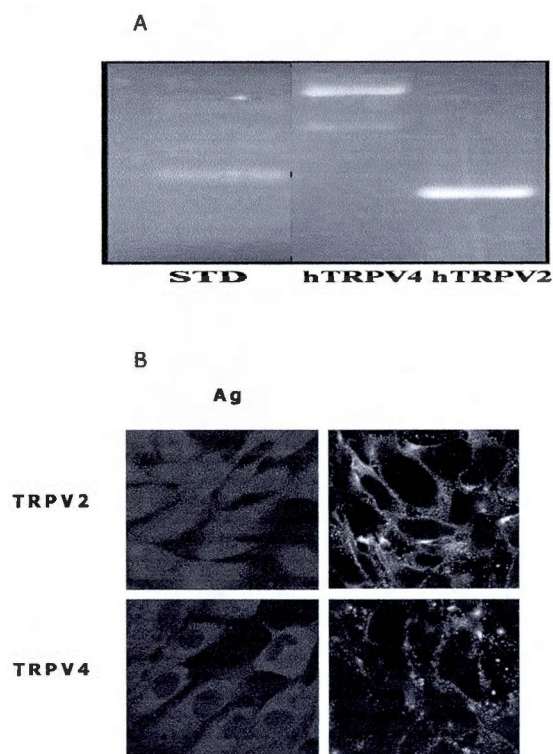


Fig. 5.6 Expression of TRPV channels by MG-63 cells. A) Total RNA was isolated from MG-63 cells and used for synthesis of complementary DNA. Amplifications by PCR were performed with specific primers for human TRPV2 or TRPV4. Representative data are shown from RNA isolations of at least three independent cultures. STD: standard or ladder of 100 bp. B) Localization of TRPV2 and TRPV4 proteins were performed by confocal microscopy with specific antibodies, and revealed by secondary fluorescence antibodies. To ascertain specific fluorescence, primary antibodies have been incubated with related antigens (left). All pictures are the same size. Representative data are shown from at least three independent cultures.

Figure 5.7. Fallah et al.

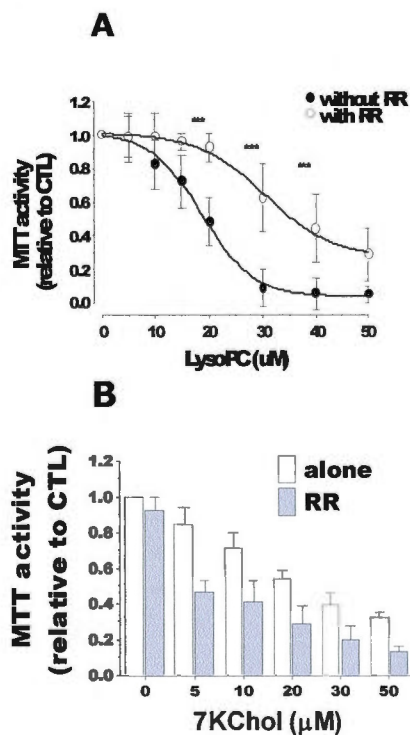


Fig. 5.7 Involvement of TRPV activation in lysoPC-induced cell death of MG-63 cells. (A) Dose-response curve of MTT activity (relative to control without lysoPC) following a 48-h exposure to increasing concentrations of lysoPC in culture medium without or with 10  $\mu$ M RR. Results are from 5 independent experiments in triplicates. Bonferroni post test: \*\*\* $p < 0.001$  when compared to condition without RR. (B) Dose-response analysis of MTT activity (relative to control) following a 48-h exposure to increasing concentrations of 7-ketocholesterol (7KChol) in culture medium. Results are from 3 independent experiments in triplicates.



Figure 5.8. Fallah et al.

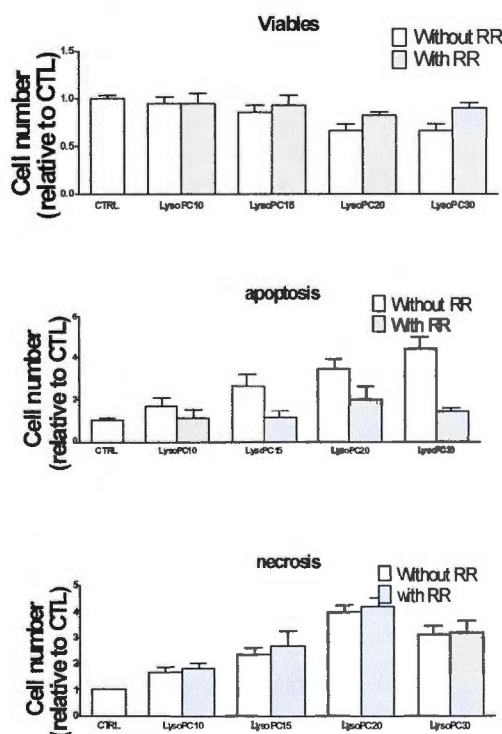


Fig. 5.8 Stimulation of TRPV channels by lysoPC promoted cell apoptosis. MG-63 cells seeded in 12-well plates were incubated in serum-free culture medium without or with 10  $\mu$ M RR in the presence of increasing concentrations of lysoPC for 24 h. The cells were then labeled with annexin-V-FITC and propidium iodide and fluorescence was analyzed by flow cytometry for viable (negative for annexin and PI), apoptotic (positive for annexin and negative for PI) and necrotic (negative for annexin and positive for PI) cells. Values are mean  $\pm$  SEM of 9 independent experiments. Bonferroni post test: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  when compared to condition without RR.

## 6. Résultats supplémentaires

Suite à nos travaux indiquant que l'activation des canaux TRPV par la lysoPC est associé à l'apoptose des cellules MG-63, nous devions identifier quel canal était responsable de cet effet. Par ailleurs, Parhami et al., 1999 a montré que la différenciation des cellules murines M2-10B4 était inhibée sous l'effet des LDL oxydées. Alors, l'étude de l'effet de la lysoPC sur la différenciation des cellules MC3T3 était un objectif de plus à explorer. De plus, des études avaient rapporté que la migration des cellules endothéliales était inhibée par la lysoPC (Chaudhuri et al., 2008) et que la lysoPC stimulait la production de ROS dans les cellules microgliales (Schilling & Eder, 2010). Ainsi, nous avons étudié l'effet de la lysoPC sur la production de ROS et la migration des cellules MG-63.

### 6.1 Méthodes

#### 6.1.1 Culture cellulaire

Les cellules humaines MG-63 et murines MC3T3 proviennent de l'«American Type Culture Collection» (ATCC ; Rockville, MD, USA). Le milieu de culture des cellules MG-63 était le «Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient mixture F-12 Ham» (DMEM/F12 ; Sigma, St Louis, MO, USA) complété avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS ; Cansera, Etobicoke, Ontario, Canada), 2 mM de L-glutamine (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), ainsi que 100 U/ml de pénicilline (Invitrogen) et 100 µg/ml de streptomycine (Invitrogen). Le milieu de culture des cellules MC3T3 était le «Minimum essential medium alpha modified» (αMEM, Invitrogen) complété avec 10% de FBS, 2 mM de L-glutamine (Invitrogen), ainsi que 100 U/ml de pénicilline (Invitrogen) et 100 µg/ml de streptomycine (Invitrogen). Une dispersion cellulaire était réalisée chaque semaine à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA (Invitrogen). Après le compte, les cellules étaientensemencées à une densité initiale de 1500 à 2500 cellules/cm<sup>2</sup> et maintenues à 37°C dans un incubateur humidifié à 5% de CO<sub>2</sub>. Le changement des milieux était effectué deux fois par semaine.

### 6.1.2 Détermination de l'effet de lysoPC sur la migration cellulaire

Afin de déterminer l'effet de la lysoPC sur la migration des ostéoblastes, les cellulesensemencées dans une plaque de 12 puits (Costar, NY, USA) ont été détachées mécaniquement à l'aide d'un embout et cette procédure a été suivie de lavages pour éliminer les cellules détachées. Les cellules ont été ensuite incubées avec des concentrations croissantes de lysoPC dans leur milieu approprié sans sérum. Des photos de la zone de la plaie ont été prises au début et après 18-20 heures du traitement ; celles-ci ont été analysées à l'aide du programme ImageJ afin de calculer le taux de migration. Ce taux a été déterminé en calculant la surface repeuplée par les cellules après 18-20 heures par rapport à la surface libre au temps 0.

### 6.1.3 Etude de l'effet de la lysoPC sur la différenciation des MC3T3

Pour établir l'effet de la lysoPC sur la différenciation ostéoblastique, les cellules MC3T3ensemencées dans une plaque de 24 puits (Costar) ont été incubées dans le milieu MEM complet auquel a été ajouté 50 µg/ml d'acide ascorbique (Sigma), 5 mM de glycérol-2-phosphate (Sigma) et des concentrations croissantes de lysoPC. Ce traitement a été répété 3 fois par semaine pendant 3 à 4 semaines. Les cultures ont ensuite été analysées pour leur contenu en phosphatase alcaline (ALP) et en dépôts calciques.

### 6.1.4 Dosage de la phosphatase alcaline(ALP)

#### 6.1.4.1 Préparation des échantillons et extraction d'ALP

L'activité de la phosphatase alcaline a été mesurée suite aux traitements de différenciation réalisés dans des plaques de 24 puits. Les cellules ont été lavées 2 fois avec un tampon phosphate (PBS) froid contenant 2.7 mM de KCl, 1.4 mM de

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 140 mM de NaCl et 10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , dont le pH est ajusté à 7.4. Les cellules de chaque puits ont été solubilisées dans 500  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse ALP (100 mM de glycine, 1 mM de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1% Triton X-100, pH 10.5) avec agitation pendant une heure à 4°C. Par la suite, les échantillons ont été transférés dans des eppendorfs identifiés, puis conservés à -20°C jusqu'au moment de l'analyse.

#### 6.1.4.2 Dosage de l'activité d'ALP

Le dosage était effectué dans une plaque de 96 puits. Une courbe standard de p-nitrophénol (PNP, Sigma) a été élaborée à chacun des dosages. Pour le dosage, 75  $\mu\text{l}$  des échantillons ont été incubés avec 75  $\mu\text{l}$  de p-nitrophényl phosphate disodium hexahydrate (PNPP, 12.5 mM, Sigma) pendant 15 à 30 minutes selon l'intensité de la coloration jaune. La réaction était arrêtée en ajoutant 100  $\mu\text{l}$  de NaOH (1 M) par puits et la lecture de la densité optique était faite à 410 nm. Les résultats ont été normalisés en fonction de la quantité de protéines.

#### 6.1.5 Dosage des protéines par microBCA

Les dosages de protéines ont été effectués dans une plaque de 96 puits à l'aide des réactifs microBCA (Pierce, Rockford, USA) selon les recommandations du fournisseur. Une courbe étalon était élaborée à partir de l'albumine sérique de bovin (BSA, Sigma) et les lectures d'absorbance ont été faites à 570 nm.

#### 6.1.6 Coloration des dépôts de calcium avec le rouge alizarine

Afin d'établir l'effet de la lysoPC sur la minéralisation de la matrice extracellulaire suite aux traitements de différenciation, l'évaluation des dépôts de calcium a été réalisée par une coloration au rouge alizarine. Le milieu de traitement des cellules en culture dans une plaque de 24 puits a été retiré et les cellules MC3T3 ont été fixées avec 500  $\mu\text{l}$  d'éthanol froid à 70% pendant 1 heure à 4°C avec agitation. Les cellules ont été lavées avec de l'eau nano pure, puis exposées à l'air pour le séchage. Par la suite, 250  $\mu\text{l}$  de Rouge Alizarine S (2%, Sigma) a été ajouté dans chaque puits

pendant 1 heure d'incubation à 37°C. Les cellules ont été par la suite rincées avec de l'eau nanopure 3 à 4 fois pendant 5 minutes et observées au microscope pour la détection des dépôts calciques sous formes de taches rouges.

#### 6.1.7 La stimulation de la production des espèces réactives oxygénées (ROS) par la lysoPC

Les cellules MG-63 ont été incubées avec des concentrations croissantes de lysoPC pour 2 heures. Après cela, les cellules ont été détachées des puits avec de la trypsine diluée et l'activité de la trypsine a été inhibée par l'ajout de milieu DMEM/F12 contenant 20 % de FBS. Les cellules ont été transférées dans des tubes, puis centrifugées à une vitesse de 1500 rpm pendant 10 minutes. Les cellules ont été marquées avec la sonde fluorescente 2',7' -dichlorofluorescein diacetate (DCDFA) (4µg/ml, molecular probes) pendant 10 minutes, puis analysées au cytofluoromètre avec une longueur d'onde d'excitation de 500 nm et d'émission mesurée à 530 nm.

#### 6.1.8 Approche statistique

Les expériences ont été répétées au moins à cinq reprises à partir des cultures cellulaires de différents passages. L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 4 en utilisant le test t de student ou le test d'Anova suivant le type d'expériences.

### 6.2 Les résultats

#### 6.2.1 La production de ROS et son implication dans la cytotoxicité de la lysoPC

Afin d'étudier l'effet de la LysoPC sur le stress oxydatif, nous avons effectué des séries d'expériences visant à mesurer le niveau de ROS suite à des traitements avec des concentrations croissantes de lysoPC. Nos résultats indiquent qu'une incubation



des cellules avec la lysoPC tend à augmenter la production de ROS (Figure 6.1). Nos résultats indiquent que la lysoPC induit la production de ROS et que cette stimulation augmente en fonction des concentrations croissantes de lysoPC. Afin de déterminer l'implication d'une production de ROS dans l'effet de la lysoPC sur la viabilité de la lignée ostéoblastique MG-63, les cellules ont été incubées avec des concentrations croissantes de lysoPC (0 à 50  $\mu$ M) pendant 48 heures en présence de l'antioxydant N-acetylcystéine (NAC), qui stimule la production du glutathion et neutralise les ROS (Wu *et al.*, 2012). La figure 6.2 montre qu'une incubation avec la lysoPC en présence du NAC n'a aucun effet de protection contre la mortalité induite par la lysoPC (Figure 6.2). Afin de déterminer si l'activation des canaux TRPV était responsable de la mortalité cellulaire induite par la lysoPC, les cellules ont été incubées avec des concentrations croissantes de lysoPC (0 à 50  $\mu$ M) pendant 48 heures en présence de RR, de RN1734 ou de tranilast. La figure 6.3 montre que le RR (10 $\mu$ M) et le tranilast (100 $\mu$ M) assurent une protection contre l'effet toxique de la lysoPC à partir 20 $\mu$ M alors que, avec RN (30 $\mu$ M), il n'y a pas de protection contre l'effet de la lysoPC.

#### 6.2.2 L'effet de la lysoPC sur la migration des cellules MG63

La migration des ostéoblastes est importante pour la régénération du tissu osseux (Fujita *et al.*, 2004). L'étude de l'effet de la lysoPC sur la migration nous permettra de mieux comprendre son rôle dans la favorisation de l'ostéoporose. Des essais de migration ont été réalisés afin de déterminer l'influence de la lysoPC sur cette fonction ostéoblastique. Les résultats montrent une absence d'effet de la lysoPC sur la migration cellulaire (Figure 6.4).

#### 6.2.3 L'effet de la lysoPC sur la différenciation des cellules MC3T3 immatures en des cellules ostéoblastiques matures

La différenciation des cellules pré-ostéoblastiques est primordiale pour la régénération du tissu osseux. Suite à ce processus, les cellules ostéoblastiques



matures expriment des marqueurs de différenciation comme la phosphatase alcaline. L'étude de l'effet de la lysoPC sur la différenciation permettra de mieux comprendre le rôle des facteurs athérogènes dans le développement de l'ostéoporose. Après l'incubation des cellules MC3T3 avec différentes concentrations de lysoPC pendant 3 à 4 semaines, l'activité de la phosphatase alcaline a été évaluée. Par la suite, les résultats ont été analysés et exprimés sous forme de ratio par rapport à la condition sans la lysoPC. Ainsi, les valeurs relatives pour les cellules non traitées et traitées sont fixées à 1. On remarque, ainsi, une absence d'effet de la lysoPC (5  $\mu$ M et 10  $\mu$ M) sur l'activité de la phosphatase alcaline (Figure 6.5). Une autre approche a été utilisée afin de mettre en évidence l'effet de la lysoPC sur la minéralisation par une coloration avec le rouge alizarine. Cette expérience montre aussi une absence d'effet de la lysoPC (5  $\mu$ M et 10  $\mu$ M) (Figure 6.6).

Figure 6.1. Fallah et al.

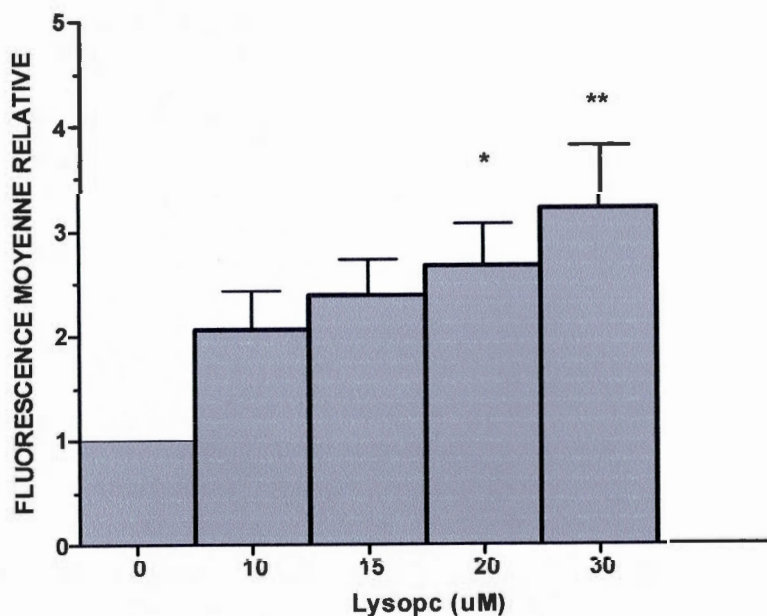


Figure 6.1 Effet de la lysoPC sur la production de ROS. Les cellules MG-63 ont été cultivées dans des plaques de 12 puits et incubées dans du milieu de culture seul (0) ou en présence de concentrations croissantes de la lysoPC pour 2 h. Par la suite, les cellules ont été incubées avec la sonde fluorescente DCDFA et la fluorescence a été analysée par cytofluorométrie (test de Dunnett, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 comparé à la condition sans lysoPC). Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM de la fluorescence relative comparée au contrôle sans lysoPC de 4 expériences indépendantes.

Figure 6.2. Fallah et al.

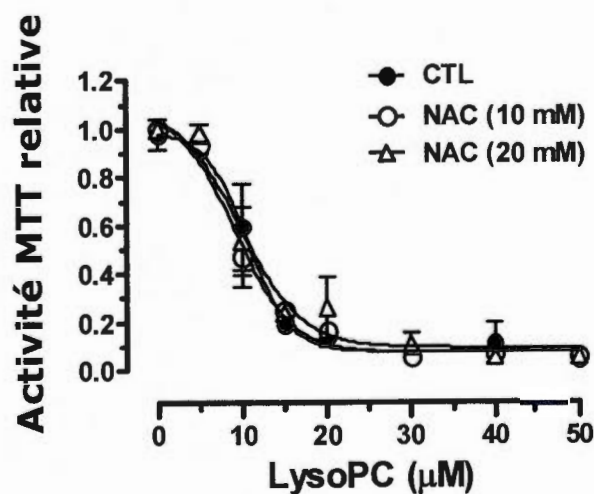


Figure 6.2 Effet du NAC sur la cytotoxicité de la lysoPC dans les cellules MG-63. Les cellules MG-63 ont été cultivées dans des plaques de 96 puits et incubées durant 48h dans du milieu de culture seul (0) ou en présence des concentrations croissantes de la lysoPC et en absence (0) ou en présence de NAC 10mM et NAC 20mM. La viabilité cellulaire a été déterminée par des essais MTT. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM de l'activité MTT relative à la condition sans lysoPC de 3 expériences indépendantes.

Figure 6.3. Fallah et al.

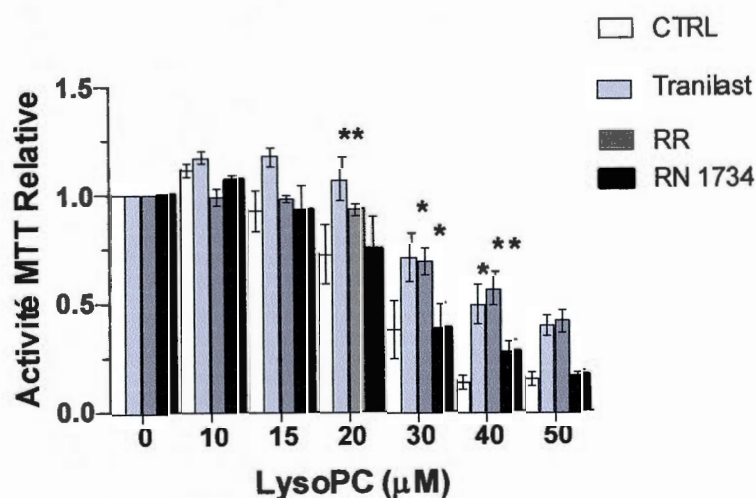


Figure 6.3 Effets des inhibiteurs des canaux TRPV sur la cytotoxicité de la lysoPC dans les cellules MG-63. Les cellules MG-63 ont été cultivées dans des plaques de 96 puits et incubées dans du milieu de culture seul (0) ou en présence des concentrations croissantes de la lysoPC et en absence (0) ou en présence de RR (10μM), Tranilast (100μM), et RN 1734 (30μM). La viabilité cellulaire a été déterminée par des essais MTT. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM de l'activité MTT relative à la condition sans lysoPC de 5 expériences indépendantes.

Figure 6.4. Fallah et al.

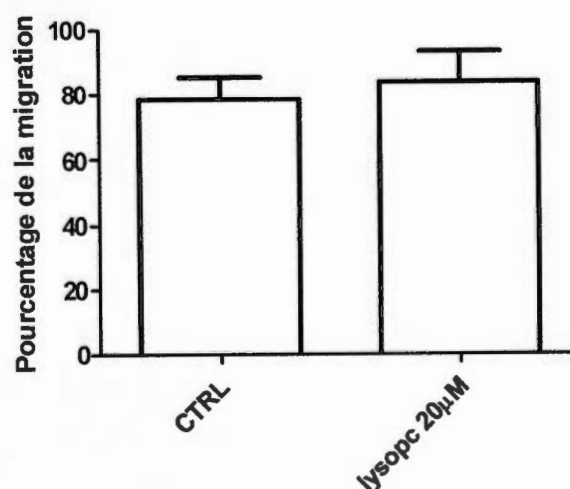


Figure 6.4 Effet de la lysoPC sur la migration des cellules MG-63. Les cellules MG-63 ont été cultivées dans des plaques de 12 puits et incubées dans du milieu de culture seul (CTRL) ou en présence de 20  $\mu$ M lysoPC pour 18 h. Le diagramme représente le pourcentage de migration des cellules MG-63. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM du pourcentage de migration de 5 expériences indépendantes.

Figure 6.5. Fallah et al.

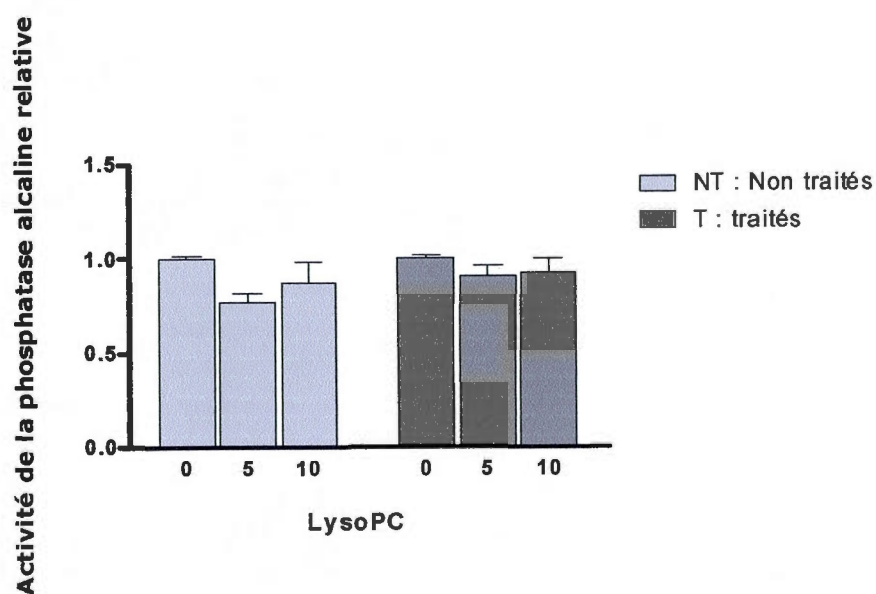


Figure 6.5 Effet de la lysoPC sur l'activité de la phosphatase alcaline suite à des traitements de différenciation ostéoblastique. Les cellules MC3T3 ont été cultivées dans des plaques de 24 puits et incubées dans du milieu de culture seul (0) ou en présence de 5  $\mu$ M et 10  $\mu$ M de lysoPC pendant 3 semaines suivant un traitement de différenciation (T) ou sans traitement (NT). Ensuite, l'activité de la phosphatase alcaline a été mesurée pour les cellules traitées et non traitées. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM de l'activité phosphatase relative au contrôle en absence de lysoPC de 3 expériences indépendantes.



Figure 6.6. Fallah et al.

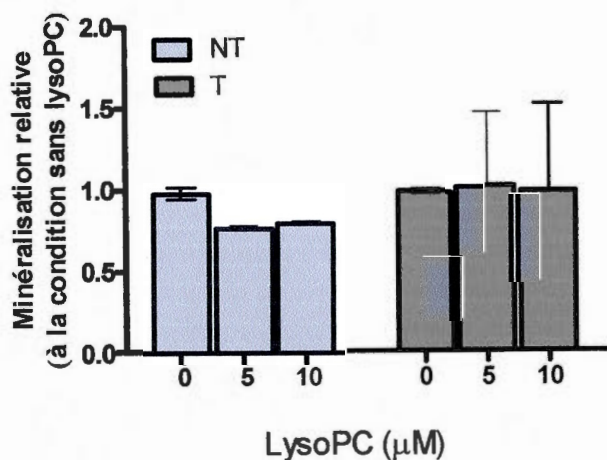


Figure 6.6 Effet de la lysoPC sur la minéralisation suite à des traitements de différenciation ostéoblastique. Les cellules MC3T3 ont été cultivées dans des plaques de 24 puits et incubées dans du milieu de culture seul (0) ou en présence de 5 µM et 10 µM de lysoPC pendant 3 semaines suivant un traitement de différenciation (T) ou sans traitement (NT). Ensuite, la minéralisation a été révélée par la coloration rouge alizarine pour les cellules traitées et non traitées. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SD de la minéralisation relative au contrôle en absence de lysoPC de 2 expériences indépendantes.

## 7. Discussion

L'ostéoporose est une maladie qui se définit par une réduction de la masse osseuse et une altération de l'architecture osseuse, ce qui s'accompagne d'une susceptibilité importante aux fractures (Masi et al., 2008). Les études épidémiologiques indiquent que les personnes ayant des maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose présentent aussi une densité minérale osseuse basse (Parhami et al., 2001; Recke et al., 1999; Reyes-Garcia et al., 2011); les femmes présentant une densité osseuse basse ont une augmentation allant jusqu'à 40% des maladies cardiovasculaires (Recke et al., 1999; Reyes-Garcia et al., 2011). Les mécanismes pathophysiologiques qui relient l'athérosclérose à l'ostéoporose sont encore peu connus (Stojanovic et al., 2011). Des études ont rapporté que l'hyperlipidémie et les lipides oxydés inhibent la différenciation ostéoblastique (Parhami et al., 2000). La lysoPC, un lipide dérivé de la dégradation de la phosphatidylcholine, est un composant libéré lors de l'oxydation des LDL. Elle perturbe la fonction de la barrière endothéliale ainsi que son intégrité (Mehta, 2005). La lysoPC induit un influx calcique dans les monocytes humains (Yun et al., 2004). La lysoPC inhibe la migration des cellules endothéliales essentielle pour la restauration de l'intégrité artérielle après une blessure vasculaire suite à l'augmentation du calcium intracellulaire (Chaudhuri et al., 2003). En plus, nos études précédentes indiquent que les LDL oxydés induisent la mort des cellules ostéoblastiques (Hamel et al., 2008).

Pour ces raisons, nous avons décidé d'étudier les mécanismes d'action de la lysoPC sur les fonctions des ostéoblastes. Nos résultats montrent que la lysoPC induit la mort cellulaire des MG-63, suivant une réponse dépendante du temps d'incubation et de la concentration de la lysoPC, selon deux modes : l'apoptose et la nécrose. Puisque la mort des cellules par apoptose est souvent due à une perte du contrôle homéostatique du calcium, nous avons déterminé le rôle du calcium extracellulaire dans l'effet toxique de la lysoPC. Nos résultats montrent que la mort cellulaire induite par la

lysoPC est diminuée quand les cellules sont incubées dans un milieu faible en calcium. De plus, le RR, un inhibiteur des canaux TRPV, assure une certaine protection des cellules MG-63 contre l'effet toxique de la lysoPC, indiquant que ce dernier est associé en partie au calcium extracellulaire et à l'activation des canaux TRPV sur les ostéoblastes. Des mesures du calcium intracellulaires ont montré que l'ajout de 20  $\mu\text{M}$  de la lysoPC, en absence du calcium extracellulaire, entraîne une augmentation de la fluorescence d'une ampleur de 2.3 fois. En absence de calcium extracellulaire, une telle augmentation de la fluorescence ne peut provenir que d'une libération d'ion des réserves intracellulaires, ce qui signifie que la lysoPC favorise une mobilisation du calcium de ces réserves. En effet, la lysoPC assure une mobilisation du calcium intracellulaire dans les neutrophiles et probablement un influx (Khan *et al.*, 2010). Afin de déterminer quelle est l'origine du calcium lors de la mobilisation induite par la lysoPC, nous avons utilisé un traitement avec la Thapsigargine (TG), ce qui assure la déplétion du réticulum endoplasmique (RE) en calcium. Suite à l'ajout de TG au milieu d'incubation en absence de calcium, nous avons observé une augmentation de la fluorescence de 2.1 fois suivie d'un retour à un niveau basal ; ce retour de la fluorescence à un niveau basal correspond à l'activité de différents processus qui permettent la recapture du calcium par d'autres organites intracellulaires et la sortie du calcium vers le milieu extracellulaire. Ainsi, en prétraitant les cellules avec la TG avant l'ajout de lysoPC, nous nous assurons que les réserves calciques du RE sont vides. En ajoutant la lysoPC après le traitement avec la TG, nous avons observé une absence de mobilisation calcique provoquée par la lysoPC. L'absence de mobilisation induite par la lysoPC avec des cellules dont les réserves du RE ont été vidées avec la TG indique bien que le calcium associée à cette mobilisation provient du RE.

Afin d'élucider le mécanisme par lequel la lysoPC provoque une mobilisation de calcium, nous avons préincubé les cellules avec le U73122, un inhibiteur de la phospholipase C, avant l'ajout de la lysoPC. Nous avons constaté une inhibition

totale de la mobilisation. Ceci nous laisse croire que la lysoPC se lie à un récepteur couplé à une protéine  $G_{\alpha q}$  (Khan *et al.*, 2010) qui va activer la phospholipase C, présente au niveau de la membrane; cette dernière va hydrolyser le PIP2 pour produire deux seconds messagers qui sont l'IP3 libéré dans le cytosol et le DAG qui restera lié à la membrane plasmique.

L'IP3 va se lier avec son récepteur au niveau du RE pour assurer la mobilisation du calcium intracellulaire qui va réguler l'action des protéines kinases dépendantes du calcium comme la calmoduline. D'après plusieurs articles, la lysoPC active des canaux « transient receptor potential » comme les TRPV2 et les TRPC5/6 influençant plusieurs fonctions cellulaires (Chaudhuri *et al.*, 2008; Monet *et al.*, 2009). Afin d'identifier le type de canaux ioniques responsables de l'influx induit par la lysoPC, nous avons d'abord caractérisé nos inhibiteurs. Selon les précédents travaux de notre laboratoire, la mobilisation du calcium du RE induite par la TG chez les cellules MG-63 stimule l'ouverture de canaux TRPC (Abed *et al.*, 2009). Suite à une stimulation avec la TG, nous avons observé que le Gd réduit complètement l'influx induit par la TG alors que le RR n'a aucun effet sur cet influx. Ainsi, nos résultats indiquent que le Gd est un bloqueur des canaux TRPC alors que le RR ne l'est pas. Celui-ci est connu dans la littérature comme un bloqueur des canaux TRPV (Jin *et al.*, 2011).

Ainsi avec ces 2 inhibiteurs, nous étions en mesure d'associer l'influx induit par la lysoPC aux canaux TRPC ou TRPV. Nous avons alors préincubé les cellules avec le Gd pour 5 minutes, puis stimulé les cellules avec de la lysoPC. Dans ces conditions où les TRPC sont inhibés, l'ajout de lysoPC a encore une fois permis d'observer un influx. Nous avons repris le même type d'expérience en préincubant cette fois les cellules avec du RR. Dans ces conditions, l'influx de calcium induit par la lysoPC a été inhibé à plus de 90%, ce qui indique que la lysoPC active des canaux TRPV.

Par la suite, nous voulions déterminer si l'activation des canaux TRPV par la lysoPC jouait un rôle important dans l'induction de l'apoptose. La lysoPC induit l'apoptose dans les cellules endothéliales humaines après 48 h de traitement en activant la caspase-3 (Park *et al.*, 2010). Pour cela, nous avons réalisé des essais d'apoptose suite aux traitements avec des concentrations croissantes de la lysoPC. Lorsque les cellules sont en apoptose, la phosphatidylserine sera délocalisée vers le feuillet externe de la membrane plasmique permettant ainsi la liaison de l'annexine V. Toutefois lors de l'apoptose, l'intégrité membranaire est conservée ce qui exclut le marquage avec l'iodure de propidium (PI). Alors que lors de la nécrose, la membrane sera perforée et le PI va entrer dans la cellule et se complexer avec l'ADN.

Nos expériences montrent que la lysoPC stimule l'apoptose. L'apoptose est un processus programmé, actif qui élimine les vieilles cellules, et qui est associé à une dégradation de l'ADN. Elle peut être induite par un stimulus extracellulaire comme le traitement avec la lysoPC (Best *et al.*, 1999). Également, nos résultats indiquent que la lysoPC stimule la nécrose en agissant comme un détergeant perforant la membrane à de hautes concentrations (Colles & Chisolm, 2000). En présence de RR, l'apoptose induite par la lysoPC était diminuée. Ce qui suggère que les canaux TRPV, activés par la lysoPC, jouent un rôle dans l'induction de l'apoptose. Au contraire, la nécrose, un processus désordonné, n'est pas réduite suite aux traitements avec le RR. Parmi les membres de la famille des canaux TRPV, nos expériences de RT-PCR et d'immunolocalisation montrent que les canaux TRPV2 et TRPV4 sont exprimés dans les cellules MG-63, et sont localisés au niveau de la membrane plasmique. Pour identifier lequel des canaux TRPV2 ou TRPV4 était impliqué dans les mécanismes d'action de la lysoPC, nous avons fait des expériences de MTT en incubant les cellules préalablement avec le tranilast et le RN-1734.

Nous avons observé en présence de l'inhibiteur des canaux TRPV2 une protection des cellules MG-63 semblable à la protection qui est amenée par le RR, suggérant que



le canal TRPV2 est celui qui est impliqué dans la cytotoxicité de la lysoPC. Le RN-1734 n'avait aucun effet sur la cytotoxicité de la lysoPC. Ceci est en accord avec d'autres publications indiquant que la lysoPC active le canal TRPV2 (Monet *et al.*, 2009). Afin de connaître davantage le mécanisme d'action de la lysoPC, nous avons étudié la production de ROS. Après 2 heures de traitement avec les concentrations croissantes de la lysoPC, la production du ROS devient significative à partir de 20 $\mu$ M chez les cellules MG-63. Ainsi, nous avons incubé les cellules MG-63 avec des concentrations croissantes de la lysoPC en présence de l'antioxydant NAC. Nos résultats n'ont montré aucune protection de la part du NAC envers l'effet de la lysoPC montrant ainsi que l'apoptose amenée par la lysoPC n'est pas liée à la production du ROS par les cellules.

La production normale de ROS dans la cellule est équilibrée par leur production et leur élimination. Ainsi, à l'état normal de la cellule, la balance redox est équilibrée grâce à des molécules antioxydants ayant un poids moléculaire faible comme le glutathion (Finkel, 2011). D'autres études ont montré la production de ROS par la lysoPC (Schilling & Eder, 2010b). La lysoPC induit la production du ROS par les cellules microgliales et joue un rôle important dans la pathogenèse des maladies neuro-dégénératives et ceci via l'activité de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH oxydase). Dans les cellules microgliales, l'inhibition des canaux TRPV1 diminuent complètement la production du ROS stimulée par la lysoPC (Schilling & Eder, 2010b). Dans les cellules MG-63, la lysoPC stimule la production du ROS. Le traitement avec la vitamine E n'amène pas à la protection contre l'effet toxique de la lysoPC (résultats non publiés), ce qui nous laisse croire que la production du ROS n'est pas associée à la mortalité. Nous avons aussi étudié l'effet de la lysoPC sur la différenciation et la migration des cellules ostéoblastiques MG-63. Les lipoprotéines de faible densité faiblement oxydées (MM-LDL) inhibent la différenciation ostéoblastique des cellules mésenchymateuses ostéoprogénitrices murines M2-10B4 et favorisent leur différenciation en des adipocytes ; ce qui cause



une diminution de la minéralisation de la masse osseuse, de l'activité de la phosphatase alcaline et de l'expression génique du collagène I (Parhami *et al.*, 1999). Suite aux traitements de différenciation en présence de concentrations croissantes de lysoPC n'ayant pas d'effet sur la viabilité cellulaire, nous n'avons observé aucun effet sur l'activité de la phosphatase alcaline, un marqueur de différenciation. Donc, la lysoPC, libéré lors de l'oxydation des LDL, n'agit pas sur la différenciation des cellules MC3T3. La cause peut être la constitution entre les LDL oxydées et la lysoPC. De plus, les M2-10B4 sont des cellules mésenchymateuses qui ont le potentiel de se différencier en ostéoblastes. Ainsi les cellules M2-10B4 sont moins différencier que les cellules MC3T3. La différence du modèle cellulaire peut être aussi une des causes de l'absence de l'effet de la lysoPC sur la différenciation des MC3T3. La coloration des dépôts de calcium associés à la minéralisation avec le rouge alizarine montre qu'il n'y a pas d'effet significatif suite aux traitements avec la lysoPC.

Donc, la lysoPC n'affecte pas la différenciation cellulaire des cellules MC3T3. La migration des cellules ostéoblastiques est importante pour la réparation des sites résorbés par les ostéoclastes. Leur migration est régulée par différentes protéines comme les intégrines qui sont responsables de l'adhésion (Koch *et al.*, 2011). Nous avons donc décidé d'étudier l'effet de la lysoPC sur la migration des cellules MG-63. Après des traitements de 18 h avec une concentration de 20 $\mu$ M, la lysoPC n'entraîne pas un effet significatif sur la migration des cellules.

## Conclusion

La lysoPC est un lipide libéré lors de l'oxydation des LDL ou suite à la modification enzymatique par la phospholipase A<sub>2</sub>. Ainsi, la lysoPC comme facteur athérogénique pourrait contribuer au développement de l'ostéoporose. Nos résultats indiquent que la lysoPC affecte la viabilité cellulaire des cellules MG-63 en causant l'apoptose. De plus, nos travaux ont montré que la lysoPC provoque une mobilisation du calcium intracellulaire du RE et un influx calcique en stimulant les canaux TRPV2. En réduisant la concentration en calcium du milieu d'incubation, la mortalité induite par la lysoPC est diminuée. De plus, l'inhibiteur des canaux TRPV, le RR, et l'inhibiteur des canaux TRPV2, le tranilast, offrent une protection contre la cytotoxicité induite par la lysoPC. Ainsi, nos résultats indiquent l'implication des canaux TRPV2 dans l'effet néfaste de la lysoPC sur la viabilité des cellules MG-63. Bien que nos analyses indiquent que la lysoPC stimule la production de ROS, l'effet de la lysoPC sur la viabilité des cellules MG-63 est indépendant de la production du ROS. Nos travaux indiquent aussi que la lysoPC n'affecte pas la migration, ni la différenciation des cellules ostéoblastiques.

Les ostéoblastes sont les cellules formatrices du tissu osseux. Ainsi, toute altération au niveau de leur viabilité et de leurs fonctions est à même d'altérer l'équilibre du remodelage osseux, qui est la résultante d'un travail coopératif entre les ostéoclastes et les ostéoblastes. Nos résultats indiquent que la lysoPC diminue la viabilité cellulaire des ostéoblastes en induisant l'apoptose suite à une activation des canaux TRPV, ils sont en accord avec les études précédentes qui rapportaient une diminution de la formation du tissu osseux par des conditions athérogéniques. Ainsi, dans ces conditions, la densité osseuse et la microarchitecture osseuse présenteront une porosité importante. Tout cela va favoriser la formation de l'ostéoporose puisqu'il y a atteinte directe de la survie

des cellules ostéoblastiques par la lysoPC. Donc, nos résultats appuient l'hypothèse que la lysoPC favorise le développement de l'ostéoporose.

[illegible]









## Bibliographie

- Abed,E., Labelle,D., Martineau,C., Loghin,A. & Moreau,R. (2009) Expression of transient receptor potential (TRP) channels in human and murine osteoblast-like cells. *Mol.Membr.Biol.*, **26**, 146-158.
- Badimon,L., Vilahur,G. & Padro,T. (2009) Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. *Rev.Esp.Cardiol.*, **62**, 1161-1178.
- Bar-Shavit,Z. (2007) The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J.Cell Biochem.*, **102**, 1130-1139.
- Best,P.J., Hasdai,D., Sangiorgi,G., Schwartz,R.S., Holmes,D.R., Jr., Simari,R.D. & Lerman,A. (1999) Apoptosis. Basic concepts and implications in coronary artery disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **19**, 14-22.
- Bohme,I. & Beck-Sickinger,A.G. (2009) Illuminating the life of GPCRs. *Cell Commun.Signal.*, **7**, 16.
- Bonewald,L.F. & Johnson,M.L. (2008) Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, **42**, 606-615.
- Borba,V.Z. & Manas,N.C. (2010) The use of PTH in the treatment of osteoporosis. *Arq Bras.Endocrinol.Metabol.*, **54**, 213-219.
- Boyce,B.F., Yao,Z. & Xing,L. (2009) Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.*, **19**, 171-180.
- Brandi,M.L. (2009) Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology.(Oxford)*, **48 Suppl 4**, iv3-iv8.

- Brini,M. & Carafoli,E. (2009) Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev.*, **89**, 1341-1378.
- Brodeur,M.R., Brissette,L., Falstraalt,L. & Moreau,R. (2008a) HDL3 reduces the association and modulates the metabolism of oxidized LDL by osteoblastic cells: a protection against cell death. *J.Cell Biochem.*, **105**, 1374-1385.
- Brodeur,M.R., Brissette,L., Falstraalt,L., Ouellet,P. & Moreau,R. (2008b) Influence of oxidized low-density lipoproteins (LDL) on the viability of osteoblastic cells. *Free Radic.Biol.Med.*, **44**, 506-517.
- Caetano-Lopes,J., Canhao,H. & Fonseca,J.E. (2007) Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol.Port.*, **32**, 103-110.
- Canalis,E., Economides,A.N. & Gazzerro,E. (2003) Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr.Rev.*, **24**, 218-235.
- Cawthon,P.M. (2011) Gender differences in osteoporosis and fractures. *Clin.Orthop.Relat Res.*, **469**, 1900-1905.
- Chai,Y.C., Howe,P.H., DiCorleto,P.E. & Chisolm,G.M. (1996) Oxidized low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine stimulate cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. Evidence for release of fibroblast growth factor-2. *J.Biol.Chem.*, **271**, 17791-17797.
- Chaudhuri,P., Colles,S.M., Bhat,M., Van Wagoner,D.R., Birnbaumer,L. & Graham,L.M. (2008) Elucidation of a TRPC6-TRPC5 channel cascade that restricts endothelial cell movement. *Mol.Biol.Cell*, **19**, 3203-3211.
- Chaudhuri,P., Colles,S.M., Damron,D.S. & Graham,L.M. (2003) Lysophosphatidylcholine inhibits endothelial cell migration by increasing

intracellular calcium and activating calpain. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **23**, 218-223.

Cheng,H. & Lederer,W.J. (2008) Calcium sparks. *Physiol Rev.*, **88**, 1491-1545.

Choi,J., Zhang,W., Gu,X., Chen,X., Hong,L., Laird,J.M. & Salomon,R.G. (2011) Lysophosphatidylcholine is generated by spontaneous deacylation of oxidized phospholipids. *Chem.Res.Toxicol.*, **24**, 111-118.

Civitelli,R. (2008) Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch.Biochem.Biophys.*, **473**, 188-192.

Clarke,B. (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clin.J.Am.Soc.Nephrol.*, **3** Suppl 3, S131-S139.

Cohen-Solal,M. & de Vernejoul,M.C. (2002) [Regulation of bone remodeling. Physiologic basis]. *Arch.Pediatr.*, **9** Suppl 2, 92s-94s.

Colles,S.M. & Chisolm,G.M. (2000) Lysophosphatidylcholine-induced cellular injury in cultured fibroblasts involves oxidative events. *J.Lipid Res.*, **41**, 1188-1198.

Dallas,S.L. & Bonewald,L.F. (2010) Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **1192**, 437-443.

Danilevicius,C.F., Lopes,J.B. & Pereira,R.M. (2007) Bone metabolism and vascular calcification. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **40**, 435-442.

Das,U.N. (2002) Nitric oxide as the mediator of the antiosteoporotic actions of estrogen, statins, and essential fatty acids. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*, **227**, 88-93.

Datta,H.K., Ng,W.F., Walker,J.A., Tuck,S.P. & Varanasi,S.S. (2008) The cell biology of bone metabolism. *J.Clin.Pathol.*, **61**, 577-587.

- Demer, L. & Tintut, Y. (2011) The roles of lipid oxidation products and receptor activator of nuclear factor-kappaB signaling in atherosclerotic calcification. *Circ. Res.*, **108**, 1482-1493.
- Ding, W.G., Toyoda, F., Ueyama, H. & Matsuura, H. (2011) Lysophosphatidylcholine enhances I(Ks) currents in cardiac myocytes through activation of G protein, PKC and Rho signaling pathways. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **50**, 58-65.
- Distelhorst, C.W. & Dubyak, G. (1998) Role of calcium in glucocorticosteroid-induced apoptosis of thymocytes and lymphoma cells: resurrection of old theories by new findings. *Blood*, **91**, 731-734.
- Duplomb, L., Dagouassat, M., Jourdon, P. & Heymann, D. (2007) Concise review: embryonic stem cells: a new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. *Stem Cells*, **25**, 544-552.
- Eriksen, E.F. (2010) Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, **11**, 219-227.
- Finkel, T. (2011) Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.*, **194**, 7-15.
- Frick, K.K., Krieger, N.S., Nehrke, K. & Bushinsky, D.A. (2009) Metabolic acidosis increases intracellular calcium in bone cells through activation of the proton receptor OGR1. *J. Bone Miner. Res.*, **24**, 305-313.
- Fujita, T., Azuma, Y., Fukuyama, R., Hattori, Y., Yoshida, C., Koida, M., Ogita, K. & Komori, T. (2004) Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. *J. Cell Biol.*, **166**, 85-95.

- Fukami,K. (2002) Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J.Biochem.*, **131**, 293-299.
- Ganss,B., Kim,R.H. & Sodek,J. (1999) Bone sialoprotein. *Crit Rev.Oral Biol.Med.*, **10**, 79-98.
- Garrett,R.H. & Grisham,C.M. (2000) les lipides. *Biochimie* (ed. by DeBoeck Université), pp. 243-249.Paris.
- Gates,B.J., Sonnett,T.E., Duvall,C.A. & Dobbins,E.K. (2009) Review of osteoporosis pharmacotherapy for geriatric patients. *Am.J.Geriatr.Pharmacother.*, **7**, 293-323.
- Gay,C.V., Gilman,V.R. & Sugiyama,T. (2000) Perspectives on osteoblast and osteoclast function. *Poult.Sci.*, **79**, 1005-1008.
- Graham,L.S., Parhami,F., Tintut,Y., Kitchen,C.M., Demer,L.L. & Effros,R.B. (2009) Oxidized lipids enhance RANKL production by T lymphocytes: implications for lipid-induced bone loss. *Clin.Immunol.*, **133**, 265-275.
- Gurban,C.V. & Mederle,O. (2011) The OPG/RANKL system and zinc ions are promoters of bone remodeling by osteoblast proliferation in postmenopausal osteoporosis. *Rom.J.Morphol.Embryol.*, **52**, 1113-1119.
- Hadjidakis,D.J. & Androulakis,I.I. (2006) Bone remodeling. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **1092**, 385-396.
- Hamel,P., Abed,E., Brissette,L. & Moreau,R. (2008) Characterization of oxidized low-density lipoprotein-induced hormesis-like effects in osteoblastic cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **294**, C1021-C1033.

- Hamerman,D. (2005) Osteoporosis and atherosclerosis: biological linkages and the emergence of dual-purpose therapies. *QJM.*, **98**, 467-484.
- Cell, Vol. 87, 1203–1214, December 27, 1996, Copyright ©1996 by Cell Press CREB Phosphorylation and Dephosphorylation: A Ca<sup>2+</sup>- and Stimulus Duration Dependent Switch for Hippocampal Gene Expression Haruhiko Bito, Karl Deisseroth, and Richard W. Tsien)
- Harvey,N., Dennison,E. & Cooper,C. (2010) Osteoporosis: impact on health and economics. *Nat.Rev.Rheumatol.*, **6**, 99-105.
- Hattar,S., Berdal,A., Asselin,A., Loty,S., Greenspan,D.C. & Sautier,J.M. (2002) Behaviour of moderately differentiated osteoblast-like cells cultured in contact with bioactive glasses. *Eur.Cell Mater.*, **4**, 61-69.
- Hisanaga,E., Nagasawa,M., Ueki,K., Kulkarni,R.N., Mori,M. & Kojima,I. (2009) Regulation of calcium-permeable TRPV2 channel by insulin in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, **58**, 174-184.
- Hong,Y.M. (2010) Atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *Korean Circ.J.*, **40**, 1-9.
- Jin,M., Wu,Z., Chen,L., Jaimes,J., Collins,D., Walters,E.T. & O'Neil,R.G. (2011) Determinants of TRPV4 activity following selective activation by small molecule agonist GSK1016790A. *PLoS.One.*, **6**, e16713.
- Jung,S., Lee,Y., Han,S., Kim,Y., Nam,T. & Ahn,D. (2008) Lysophosphatidylcholine Increases Ca Current via Activation of Protein Kinase C in Rabbit Portal Vein Smooth Muscle Cells. *Korean J.Physiol Pharmacol.*, **12**, 31-35.
- Kawate,H. & Takayanagi,R. (2011) Efficacy and safety of bazedoxifene for postmenopausal osteoporosis. *Clin.Interv.Aging*, **6**, 151-160.



- Khajuria,D.K., Razdan,R. & Mahapatra,D.R. (2011) Drugs for the management of osteoporosis: a review. *Rev.Bras.Reumatol.*, **51**, 365-382.
- Khan,S.Y., McLaughlin,N.J., Kelher,M.R., Eckels,P., Gamboni-Robertson,F., Banerjee,A. & Silliman,C.C. (2010) Lysophosphatidylcholines activate G2A inducing G( $\alpha$ h)(-)(1)-/G( $\alpha$ q)(1)(1)- Ca(2)(+) flux, G( $\beta$ g)-Hck activation and clathrin/beta-arrestin-1/GRK6 recruitment in PMNs. *Biochem.J.*, **432**, 35-45.
- Koch,F.P., Wunsch,A., Merkel,C., Ziebart,T., Pabst,A., Yekta,S.S., Blessmann,M. & Smeets,R. (2011) The influence of bisphosphonates on human osteoblast migration and integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3/tenascin C gene expression in vitro. *Head Face.Med.*, **7**, 4.
- Kristian,T. & Siesjo,B.K. (1998) Calcium in ischemic cell death. *Stroke*, **29**, 705-718.
- Lian,J.B. & Stein,G.S. (1992) Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev.Oral Biol.Med.*, **3**, 269-305.
- Libby,P., Ridker,P.M. & Hansson,G.K. (2009) Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J.Am.Coll.Cardiol.*, **54**, 2129-2138.
- Mackiewicz,Z., Niklinska,W.E., Kowalewska,J. & Chyczewski,L. (2011) Bone as a source of organism vitality and regeneration. *Folia Histochem.Cytobiol.*, **49**, 558-569.
- Marty,C. & Ye,R.D. (2010) Heterotrimeric G protein signaling outside the realm of seven transmembrane domain receptors. *Mol.Pharmacol.*, **78**, 12-18.
- Mehta,D. (2005) Lysophosphatidylcholine: an enigmatic lysolipid. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, **289**, L174-L175.

- Mellis,D.J., Itzstein,C., Helfrich,M.H. & Crockett,J.C. (2011) The skeleton: a multi-functional complex organ: the role of key signalling pathways in osteoclast differentiation and in bone resorption. *J.Endocrinol.*, **211**, 131-143.
- Minke,B. & Cook,B. (2002) TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev.*, **82**, 429-472.
- Mizuno,Y., Jacob,R.F. & Mason,R.P. (2011) Inflammation and the development of atherosclerosis. *J.Atheroscler.Thromb.*, **18**, 351-358.
- Monet,M., Gkika,D., Lehen'kyi,V., Pourtier,A., Vanden Abeele,F., Bidaux,G., Juvin,V., Rassendren,F., Humez,S. & Prevarsakaya,N. (2009) Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. *Biochim.Biophys.Acta*, **1793**, 528-539.
- Morales,S., Diez,A., Puyet,A., Camello,P.J., Camello-Almaraz,C., Bautista,J.M. & Pozo,M.J. (2007) Calcium controls smooth muscle TRPC gene transcription via the CaMK/calcineurin-dependent pathways. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **292**, C553-C563.
- Nakamura,Y. & Fukami,K. (2009) Roles of phospholipase C isozymes in organogenesis and embryonic development. *Physiology.(Bethesda.)*, **24**, 332-341.
- Newton,A.C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J.Biol.Chem.*, **270**, 28495-28498.
- Nilius,B., Owsianik,G., Voets,T. & Peters,J.A. (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev.*, **87**, 165-217.

- Nishimura,R., Hata,K., Matsubara,T., Wakabayashi,M. & Yoneda,T. (2012) Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. *J.Biochem.*, **151**, 247-254.
- O'Neil,R.G. & Heller,S. (2005) The mechanosensitive nature of TRPV channels. *Pflugers Arch.*, **451**, 193-203.
- Orimo,H. (2010) The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J.Nihon Med.Sch*, **77**, 4-12.
- Parhami,F., Garfinkel,A. & Demer,L.L. (2000) Role of lipids in osteoporosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **20**, 2346-2348.
- Parhami,F., Jackson,S.M., Tintut,Y., Le,V., Balucan,J.P., Territo,M. & Demer,L.L. (1999) Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *J.Bone Miner.Res.*, **14**, 2067-2078.
- Parhami,F., Tintut,Y., Beamer,W.G., Gharavi,N., Goodman,W. & Demer,L.L. (2001) Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. *J.Bone Miner.Res.*, **16**, 182-188.
- Park,S., Kim,J.A., Choi,S. & Suh,S.H. (2010) Superoxide is a potential culprit of caspase-3 dependent endothelial cell death induced by lysophosphatidylcholine. *J.Physiol Pharmacol.*, **61**, 375-381.
- Pedersen,S.F., Owsianik,G. & Nilius,B. (2005) TRP channels: an overview. *Cell Calcium*, **38**, 233-252.
- Pivodova,V., Frankova,J. & Ulrichova,J. (2011) Osteoblast and gingival fibroblast markers in dental implant studies. *Biomed.Pap.Med.Fac.Univ Palacky.Olomouc.Czech.Repub.*, **155**, 109-116.

- Qiao,J., Huang,F., Naikawadi,R.P., Kim,K.S., Said,T. & Lum,H. (2006) Lysophosphatidylcholine impairs endothelial barrier function through the G protein-coupled receptor GPR4. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, **291**, L91-101.
- Quinn,M.T., Parthasarathy,S. & Steinberg,D. (1988) Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A*, **85**, 2805-2809.
- Radu,C.G., Yang,L.V., Riedinger,M., Au,M. & Witte,O.N. (2004) T cell chemotaxis to lysophosphatidylcholine through the G2A receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A*, **101**, 245-250.
- Ramsey,S.A., Gold,E.S. & Aderem,A. (2010) A systems biology approach to understanding atherosclerosis. *EMBO Mol.Med.*, **2**, 79-89.
- Rebeca Reyes-García, Pedro Rozas-Moreno, Manuel Munoz-Torres. (2011) Cardiovascular disease and bone metabolism. *Endocrinol Nutr.* 2011;58(7):353-359.
- Rebecchi,M.J. & Pentyala,S.N. (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev.*, **80**, 1291-1335.
- Schilling,T. & Eder,C. (2010a) Importance of lipid rafts for lysophosphatidylcholine-induced caspase-1 activation and reactive oxygen species generation. *Cell Immunol.*, **265**, 87-90.
- Schilling,T. & Eder,C. (2010b) Stimulus-dependent requirement of ion channels for microglial NADPH oxidase-mediated production of reactive oxygen species. *J.Neuroimmunol.*, **225**, 190-194.

- Stains,J.P. & Civitelli,R. (2003) Genomic approaches to identifying transcriptional regulators of osteoblast differentiation. *Genome Biol.*, **4**, 222.
- Stock,C., Schilling,T., Schwab,A. & Eder,C. (2006) Lysophosphatidylcholine stimulates IL-1beta release from microglia via a P2X7 receptor-independent mechanism. *J.Immunol.*, **177**, 8560-8568.
- Stojanovic,O.I., Lazovic,M., Lazovic,M. & Vuceljic,M. (2011) Association between atherosclerosis and osteoporosis, the role of vitamin D. *Arch.Med.Sci*, **7**, 179-188.
- Suda,T. & Takahashi,N. (2008) Contributions to osteoclast biology from Japan. *Proc.Jpn.Acad.Ser.B Phys.Biol.Sci*, **84**, 419-438.
- Sudo,H., Kodama,H.A., Amagai,Y., Yamamoto,S. & Kasai,S. (1983) In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J.Cell Biol.*, **96**, 191-198.
- Suh,P.G., Park,J.I., Manzoli,L., Cocco,L., Peak,J.C., Katan,M., Fukami,K., Kataoka,T., Yun,S. & Ryu,S.H. (2008) Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB.Rep.*, **41**, 415-434.
- Sweet,M.G., Sweet,J.M., Jeremiah,M.P. & Galazka,S.S. (2009) Diagnosis and treatment of osteoporosis. *Am.Fam.Physician*, **79**, 193-200.
- Sykaras,N. & Opperman,L.A. (2003) Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *J.Oral Sci*, **45**, 57-73.
- Takenouchi,T., Sato,M. & Kitani,H. (2007) Lysophosphatidylcholine potentiates Ca<sup>2+</sup> influx, pore formation and p44/42 MAP kinase phosphorylation mediated by P2X7 receptor activation in mouse microglial cells. *J.Neurochem.*, **102**, 1518-1532.

- Tanko,L.B., Christiansen,C., Cox,D.A., Geiger,M.J., McNabb,M.A. & Cummings,S.R. (2005) Relationship between osteoporosis and cardiovascular disease in postmenopausal women. *J.Bone Miner.Res.*, **20**, 1912-1920.
- Tilley,D.G. (2011) G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function. *Circ.Res.*, **109**, 217-230.
- Tordoff,M.G. (2001) Calcium: taste, intake, and appetite. *Physiol Rev.*, **81**, 1567-1597.
- Tsourdi,E., Rachner,T.D., Rauner,M., Hamann,C. & Hofbauer,L.C. (2011) Denosumab for bone diseases: translating bone biology into targeted therapy. *Eur.J.Endocrinol.*, **165**, 833-840.
- Vandrovcova,M. & Bacakova,L. (2011) Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. *Physiol Res.*, **60**, 403-417.
- Vazquez,G., Wedel,B.J., Aziz,O., Trebak,M. & Putney,J.W., Jr. (2004) The mammalian TRPC cation channels. *Biochim.Biophys.Acta*, **1742**, 21-36.
- Vickers,K.C., Castro-Chavez,F. & Morrisett,J.D. (2010) Lyso-phosphatidylcholine induces osteogenic gene expression and phenotype in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, **211**, 122-129.
- Vilardaga,J.P., Agnati,L.F., Fuxe,K. & Ciruela,F. (2010) G-protein-coupled receptor heteromer dynamics. *J.Cell Sci*, **123**, 4215-4220.
- Vincent,F., Acevedo,A., Nguyen,M.T., Dourado,M., DeFalco,J., Gustafson,A., Spiro,P., Emerling,D.E., Kelly,M.G. & Duncton,M.A. (2009) Identification and characterization of novel TRPV4 modulators. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **389**, 490-494.



- Vischer,H.F., Watts,A.O., Nijmeijer,S. & Leurs,R. (2011) G protein-coupled receptors: walking hand-in-hand, talking hand-in-hand? *Br.J.Pharmacol.*, **163**, 246-260.
- von der Recke P, Hansen MA, Hassager C. (1999) The association between low bone mass at the menopause and cardiovascular mortality. *Am J Med.* 1999 Mar;106(3):273-8.
- Vriens,J., Nilius,B. & Vennekens,R. (2008) Herbal compounds and toxins modulating TRP channels. *Curr.Neuropharmacol.*, **6**, 79-96.
- Watanabe,N., Zmijewski,J.W., Takabe,W., Umez-Goto,M., Le Goffe,C., Sekine,A., Landar,A., Watanabe,A., Aoki,J., Arai,H., Kodama,T., Murphy,M.P., Kalyanaraman,R., Darley-Usmar,V.M. & Noguchi,N. (2006) Activation of mitogen-activated protein kinases by lysophosphatidylcholine-induced mitochondrial reactive oxygen species generation in endothelial cells. *Am.J.Pathol.*, **168**, 1737-1748.
- Wen,A.Y., Sakamoto,K.M. & Miller,L.S. (2010) The role of the transcription factor CREB in immune function. *J.Immunol.*, **185**, 6413-6419.
- Williams,J.P., Micoli,K. & McDonald,J.M. (2010) Calmodulin-an often-ignored signal in osteoclasts. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **1192**, 358-364.
- Wu,Q., Liu,P., Li,Y., Du,M., Xing,X. & Wang,D. (2012) Inhibition of ROS elevation and damage to mitochondrial function prevents lead-induced neurotoxic effects on structures and functions of AFD neurons in *Caenorhabditis elegans*. *J.Environ.Sci (China)*, **24**, 733-742.

- Yanamadala,V., Negoro,H. & Denker,B.M. (2009) Heterotrimeric G proteins and apoptosis: intersecting signaling pathways leading to context dependent phenotypes. *Curr.Mol.Med.*, **9**, 527-545.
- Yavropoulou,M.P. & Yovos,J.G. (2008) Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J.Musculoskelet.Neuronal.Interact.*, **8**, 204-216.
- Yu W, Warren G. Hill, Gerard Apodaca and Mark L. Zeidel. (2011) Expression and distribution of transient receptor potential (TRP) channels in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011 January; 300(1): F49–F59.
- Yun,M.R., Okajima,F. & Im,D.S. (2004) The action mode of lysophosphatidylcholine in human monocytes. *J.Pharmacol.Sci*, **94**, 45-50.
- Zheng,Q., Li,J.Q., Kazachkov,M., Liu,K. & Zou,J. (2012) Identification of Brassica napus lysophosphatidylcholine acyltransferase genes through yeast functional screening. *Phytochemistry*, **75**, 21-31.
- Zhu,M.X. (2005) Multiple roles of calmodulin and other Ca(2+)-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. *Pflugers Arch.*, **451**, 105-115.